



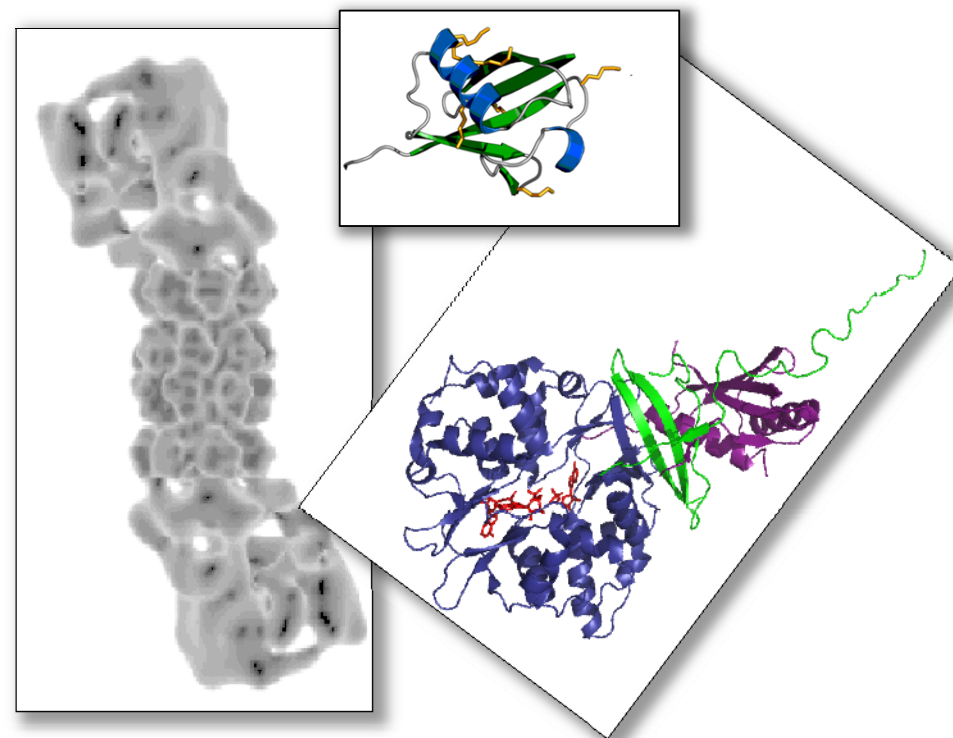
“Para llegar al alba hay que recorrer el
sendero de la noche”

Gibran

TESIS DOCTORAL

Daniel Moreno Andrés

2009



AMPK, UBICUITINACIÓN Y PROTEASOMA

TESIS DOCTORAL
Daniel Moreno Andrés



AMPK, UBICUITINACIÓN Y PROTEASOMA

**Memoria presentada por Daniel Moreno Andrés
para optar al grado de Doctor en Bioquímica.
Valencia 2009**





Instituto de Biomedicina de Valencia



ciberer

Centro de Investigación
Biomédica En Red

D. Pascual Felipe Sanz Bigorra, Doctor en Farmacia e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y

CERTIFICA:

Que Don. **Daniel Moreno Andrés**, licenciado en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título *“AMPK, UBICUITINACIÓN Y PROTEASOMA”*.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 14 de septiembre de 2009.

Dr. Pascual F. Sanz Bigorra

Para la realización de esta Tesis, el autor ha disfrutado de una Beca I3P (I3P-2005) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Health benefits of exercise: identification of genes and signalling pathways involved in effects of exercise on insulin resistance, obesity and the metabolic syndrome.” (LSHM-CT-2004-005272) y “Relación funcional entre la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y el complejo fosfatasa PPI. Su efecto en la regulación y fisiopatología del metabolismo del glucógeno” (SAF2005-00852), financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia.

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Desde muy pequeño me fascinó la ciencia, sobre todo aquella que estudiaba las estrellas...

Así cierto día, pedí a los magos de oriente uno de esos pequeños telescopios que me permitieran, en lo posible, ver más de cerca las constelaciones. Cuál fue mi sorpresa cuando descubrí que sus majestades se habían equivocado de sistema óptico y llegó a mis manos un microscopio. Me di cuenta entonces de que existía algo que me maravillaba más que los astros: ¿Cómo se explica la vida? ¿Cómo funcionan los seres que la poseen?

Siguiendo el camino para hallar la respuesta, llegué hasta aquí, gracias al esfuerzo y apoyo incondicional e incansable de mis padres, que nunca podré agradecer bastante y también a la complicidad de mi hermana que, aún en la distancia, es la mejor las ayudas.

Un camino que he tenido la fortuna de compartir con mucha gente. Lo he compartido con mi chica, que me equilibra porque tiene el don de hacerme ver que hay más mundo que el que se rige por las leyes de la ciencia. También con muy buenos amigos, profesores y compañeros fuera y aquí en el IBV. Y además con un equipo extraordinario guiado por Pascual, que siempre ha visto el camino cuando los demás no veíamos nada, y al que agradezco la oportunidad, la confianza y la paciencia que me ha brindado. Un equipo que día a día ha conseguido que el difícil camino de la ciencia se me haya hecho más fácil. Con ellos he aprendido la técnica y he descubierto que los mismos valores de compañerismo, tesón, paciencia y reflexión, que ya me enseñaron mis padres y abuelos trabajando en el campo, se aplican igualmente entre tubos de ensayo.

Todavía no sé la respuesta y tengo muchas más preguntas pero a todos ellos debo enorme gratitud por acompañarme, ayudarme y enseñarme.

Índices

Índice general

ÍNDICES	11
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS	21
INTRODUCCIÓN	27
I) AMPK	30
1 Estructura y localización subcelular de AMPK.....	31
1.1 AMPK α : estructura y localización subcelular.....	31
1.2 AMPK β : estructura y localización subcelular.....	34
1.3 AMPK γ : estructura y localización subcelular	35
2 Regulación molecular de la actividad de AMPK.....	35
2.1 Activación de AMPK.....	35
2.1.1 Quinasas de AMPK.....	37
2.2 Inactivación de AMPK.....	38
2.3 Estabilidad de AMPK.....	39
3 Eventos moduladores del estado de activación de AMPK.....	40
3.1 Eventos fisiológicos	40
3.1.1 Ejercicio y contracción muscular.....	40
3.1.2 Ligandos extracelulares.....	40
3.1.3 Estrés y activación de AMPK.....	41
3.2 Eventos farmacológicos activadores	42
3.2.1 Compuestos químicos que aumentan la relación AMP/ATP	43
3.2.2 Compuestos químicos que NO aumentan la relación AMP/ATP	43
3.2.3 Compuestos naturales	45
3.3 Eventos farmacológicos inactivadores.....	47
3.4 Uso de mutantes en la regulación de AMPK	47
4 Reconocimiento de proteínas diana por AMPK.....	48
5 Efectos fisiológicos de AMPK.....	49
5.1 AMPK y metabolismo energético	49
5.2 AMPK, metabolismo de proteínas, crecimiento y ciclo celular	53
5.2.1 AMPK y síntesis de proteínas.....	54
5.2.2 AMPK y degradación de proteínas.....	54
II) SISTEMA UPS	56
1 Ubicuitinación	57
1.1 Ubicuitina	57
1.2 Ubicuitina ligasas.....	58
1.2.1 Malina: una E3 ubiquitina ligasa	61
1.2.2 MDM2: una E3 ubiquitina ligasa	61
1.3 Deubiquitinasas	62
1.4 Funciones de la ubiquitinación.....	62

ÍNDICE GENERAL

2	<i>El proteasoma</i>	65
2.1	Estructura y funcionamiento del proteasoma	65
2.1.1	Estructura y funcionamiento del núcleo catalítico 20S	66
2.1.2	Estructura y funcionamiento de la partícula reguladora 19S	67
2.1.3	Otras partículas reguladoras.....	69
2.2	Modulación de la actividad proteasomal.....	70
2.2.1	Regulación de la actividad proteasomal por PKA	72
2.3	Funciones celulares del proteasoma	72
2.3.1	Proliferación y apoptosis	72
2.3.2	Regulación de la expresión génica a varios niveles.	73
	OBJETIVOS	75
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
1	<i>Reactivos comunes de Biología Molecular</i>	81
2	<i>Material biológico y condiciones de crecimiento</i>	81
2.1	Cepas bacterianas	81
2.2	Cepas de levadura	82
2.3	Cultivos celulares.....	83
3	<i>Plásmidos</i>	85
3.1	Vectores de expresión en levadura	85
3.2	Vectores de expresión en bacterias	85
3.3	Vectores de expresión en células de mamífero.....	85
3.4	Construcciones solicitadas.....	86
3.5	Obtención de construcciones génicas	86
3.5.1	Clonación de subunidades de la partícula 19S	87
3.5.2	Clonación de subunidades de AMPK	90
3.5.3	Clonación de otras proteínas	92
4	<i>Análisis de proteínas</i>	92
4.1	Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Western Blot)	92
4.2	Desnudado de membranas (Stripping)	95
4.3	Electroforesis bidimensional.....	95
5	<i>Doble híbrido</i>	96
5.1	Ensayos β -galactosidasa.....	97
6	<i>Ensayo de coimmunoprecipitación en líneas celulares de mamífero</i>	98
7	<i>Expresión y purificación de proteínas recombinantes en Escherichia coli</i>	98
8	<i>Ensayos de fosforilación in vitro</i>	99
9	<i>Análisis de viabilidad y ciclo celular</i>	100
10	<i>Determinación de la actividad del proteasoma in vivo</i>	101
11	<i>Determinación de la actividad proteasomal in vitro</i>	102
12	<i>Análisis de Ubiquitinación in vivo</i>	103
13	<i>Inmunofluorescencia y microscopía confocal</i>	104

RESULTADOS	107
I) EFECTO DE AMPK SOBRE EL PROTEASOMA	109
1 <i>Análisis de la interacción física entre AMPK y PSMD11</i>	111
2 <i>Análisis de la fosforilación de PSMD11 por AMPK in vitro</i>	114
3 <i>Análisis de la fosforilación de PSMD11 por AMPK in vivo</i>	119
4 <i>Análisis del efecto de AMPK sobre la actividad proteolítica del proteasoma</i>	121
4.1 Efecto mediado por AMPK de AICAR y metformina sobre la actividad del proteasoma en MEFs.	122
4.2 Efecto de otras sustancias activadoras de AMPK sobre la actividad del proteasoma en MEFs	123
5 <i>Acción de A-769662 sobre la actividad proteolítica del proteasoma</i>	126
5.1 Determinación de IC ₅₀ de A-769662 sobre la actividad proteolítica del proteasoma in vivo.	129
5.2 El efecto de A-769662 sobre la actividad proteasomal es reversible.	130
5.3 Determinación del nivel de actuación de A-769662 sobre el proteasoma.	131
5.4 Toxicidad y efectos de A-769662 sobre el ciclo celular.	134
II) EFECTO DEL UPS SOBRE AMPK	139
1 <i>AMPK se ubiquitina</i>	141
2 <i>El complejo laforina-malina promueve la ubiquitinación de las subunidades de AMPK libres</i>	143
3 <i>Mapeo de la ubiquitinación de AMPK por laforina-malina</i>	146
4 <i>La fosforilación de la treonina 172 de AMPKα2 afecta la ubiquitinación por laforina-malina</i>	149
5 <i>Acción de laforina-malina sobre el complejo trimérico de AMPK</i>	150
6 <i>Efecto de laforina-malina sobre la estabilidad de AMPK</i>	153
7 <i>Tipo de cadenas de ubiquitina introducidas por el complejo laforina-malina sobre AMPK</i>	155
8 <i>Función de la poliubiquitinación K63 mediada por laforina-malina en AMPK</i>	158
DISCUSIÓN	165
1 <i>Efecto de AMPK sobre el proteasoma</i>	168
1.1 PSMD11	168
1.2 A-769662	171
2 <i>Efecto de UPS sobre AMPK</i>	174
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	185

Índice de Figuras

FIGURA 1. ESTRUCTURA Y DOMINIOS DE LAS SUBUNIDADES DE AMPK Y SNF1.....	33
FIGURA 2. ESQUEMA DE ACTIVACIÓN DE AMPK.....	37
FIGURA 3. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA CONSENSO DE RECONOCIMIENTO DE AMPK SOBRE VARIAS PROTEÍNAS, LAS CUALES FOSFORILA DE MANERA FISIOLÓGICA.....	49
FIGURA 4. ESQUEMA DE LAS ACCIONES DE AKT Y AMPK EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	50
FIGURA 5. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE mTOR EN AUTOFAGIA Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS. EN GRIS LAS RELACIONES HIPOTÉTICAS NO PROBADAS.....	55
FIGURA 6. UBICUITINA.....	58
FIGURA 7. ESQUEMA DEL MECANISMO DE UBICUITINACIÓN Y DEUBICUITINACIÓN DE UN SUSTRATO.....	59
FIGURA 8. ESQUEMA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CADENAS MONO Y POLIUBICUITINADAS.....	64
FIGURA 9. ESTRUCTURA DEL PROTEASOMA Y FUNCIÓN DE ALGUNA DE SUS SUBUNIDADES.....	66
FIGURA 10. ORGANIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL LID.....	68
FIGURA 11. PSMD11 CO-IMMUNOPRECIPITA CON AMPK α 2 Y AMPK β 2.....	112
FIGURA 12. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA PSMD11.....	113
FIGURA 13. FOSFORILACIÓN IN VITRO DE PSMD11 POR AMPK.....	116
FIGURA 14. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIA DE PSMD11 CON CLUSTAL 2.0.5.....	118
FIGURA 15. AMPK FOSFORILA A PSMD11 IN VIVO.....	120
FIGURA 16. LA ACTIVACIÓN DE AMPK CON AICAR Y METFORMINA REDUCE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL PROTEASOMA.....	123
FIGURA 17. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL PROTEASOMA DE MEFs DE TIPO SILVESTRE EN PRESENCIA DE DIFERENTES FÁRMACOS.....	124
FIGURA 18. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL PROTEASOMA DE MEFs DOBLES MUTANTES DE AMPK α 1 Y AMPK α 2 EN PRESENCIA DE DIFERENTES FÁRMACOS.....	125
FIGURA 19. CONFIRMACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE A-769662 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA.....	128
FIGURA 20. DETERMINACIÓN DE LA IC50 DE INHIBICIÓN DE A-769662 SOBRE EL PROTEASOMA.....	129
FIGURA 21. EL EFECTO DE A-769662 SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEASOMAL ES INDEPENDIENTE DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DEL PROTEASOMA Y, ADEMÁS, REVERSIBLE.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 22. A-769662 AFECTA LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE PROTEASOMAS PURIFICADOS 26S PERO NO LA ACTIVIDAD DE PROTEASOMAS PURIFICADOS 20S	132
FIGURA 23. ENSAYO PEPTIDASA EN GEL DE PROTEASOMAS 20S Y 26S.	133
FIGURA 24. A-769662 TIENE EFECTOS TÓXICOS SOBRE MEFs.	135
FIGURA 25. A-769662 AFECTA AL CICLO CELULAR.....	136
FIGURA 26. LA PARADA DEL PROTEASOMA CON MG132 INDUCE LA ACUMULACIÓN DE FORMAS POLIUBICUITINADAS DE SUBUNIDADES DE AMPK.....	142
FIGURA 27. LA SOBREEXPRESIÓN DE DOS UBICUITINA LIGASAS INDUCE LA ACUMULACIÓN DE FORMAS POLIUBICUITINADAS DE SUBUNIDADES DE AMPK.....	144
FIGURA 28. LA ACCIÓN DEL COMPLEJO LAFORINA-MALINA SOBRE AMPK ES ESPECÍFICA.	145
FIGURA 29. OTRAS ISOFORMAS DE SUBUNIDADES DE AMPK TAMBIÉN SON MODIFICADAS POR EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA.	146
FIGURA 30. MAPEO DE LA UBICUITINACIÓN DE AMPK POR EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA.	148
FIGURA 31. LA CONFORMACIÓN ABIERTA O CERRADA DE AMPK α 2 MODIFICA SU UBICUITINACIÓN POR LAFORINA-MALINA.....	150
FIGURA 32. ACCIÓN DEL COMPLEJO LAFORINA-MALINA EN LA UBICUITINACIÓN DEL COMPLEJO TRIMÉRICO AMPK.	152
FIGURA 33. EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA NO ACELERA LA DEGRADACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE AMPK.....	154
FIGURA 34. EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA INTRODUCE UBICUITINA CON RAMIFICACIÓN K63 SOBRE AMPK.....	156
FIGURA 35. EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA INTRODUCE UBICUITINA CON RAMIFICACIÓN K63 SOBRE AMPK.....	157
FIGURA 36. EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA ESTABILIZA AMPK β 2 MIENTRAS QUE CIDEA PROMUEVE LA DEGRADACIÓN DE AMPK β 2.	159
FIGURA 37. LA PRESENCIA DEL COMPLEJO LAFORINA-MALINA NO AFECTABA A LA ACTIVIDAD DE AMPK.	160
FIGURA 38. EL COMPLEJO LAFORINA-MALINA INDUCE UN INCREMENTO DE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE AMPK β PERO NO DE AMPK α	162
FIGURA 39. ACCIÓN DIRECTA DE AMPK SOBRE EL METABOLISMO DE PROTEÍNAS.....	171

Índice de Tablas

TABLA 1. EFECTO DE HORMONAS Y CITOQUINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMPK EN DIFERENTES TEJIDOS.	41
TABLA 2. RUTAS METABÓLICAS REGULADAS POR AMPK.	52
TABLA 3. FÁRMACOS Y AGENTES QUÍMICOS	81
TABLA 4. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.	88
TABLA 5. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS ANALIZADAS POR SDS-PAGE.	93
TABLA 6. INTERACCIÓN POR DOBLE HÍBRIDO DE PSMD11 CON LAS DIFERENTES SUBUNIDADES DE AMPK.....	111
TABLA 7. INTERACCIÓN POR DOBLE HÍBRIDO DE AMPK β 2 CON LOS DIFERENTES DOMINIOS DE PSMD11 Y CON PSMD12, PSMD13; PSMD14 Y CSN2.....	114
TABLA 8. AGENTES QUÍMICOS Y SUS DISOLVENTES.....	121

Abreviaturas, acrónimos y siglas

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

2-DE:	Electroforesis bidimensional
° C:	Grado centígrado
ACCI/ACC2:	Isoformas 1 (α) y 2 (β) de la acetil-CoA carboxilasa
ADP	Adenosina difosfato
AICAR:	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribofuranósido
AID;	<i>autoinhibitory domain</i> (dominio de autoinhibición)
AMP:	Adenosina monofosfato
AMPK:	<i>AMP-activated protein kinase</i> (proteína quinasa activada por AMP)
ASC:	<i>Association with SNF1 complex</i>
ATP:	Adenosin trifosfato
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albúmina de suero bovino)
CA:	Constitutivamente activo
CaMK:	<i>Calcium/calmodulin dependent protein kinase</i> (proteína quinasa calcio/calmodulina-dependiente)
CaMKK:	<i>CaMK kinase</i> (proteína quinasa de CaMK)
cAMP:	<i>cyclic AMP</i> (AMP cíclico)
CBS:	<i>Cystathionine β-Synthase</i>
cDNA:	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (DNA complementario)
CIDE	<i>cell death inducing DFF45-like effector</i>
CMV:	<i>Cytomegalovirus</i>
C-terminal:	Extremo carboxilo-terminal
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DN:	Dominante negativo
DO:	Densidad óptica
DTT:	<i>DL-Dithiothreitol</i>
DUBs	<i>Deubiquitinases</i> (desubcuitinasas)
EC:	Extracto crudo
EGCG	<i>epigallocatechin-3-gallate</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF-2:	<i>Elongation Factor-2</i> (factor de elongación-2)
EPM2A/2B:	<i>Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 gene A/B</i> (gen A/B de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2)
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i> (suero bovino fetal)
GAD:	<i>Gal4 Activating Domain</i> (dominio de activación de Gal4)
GBD:	<i>Glycogen-Binding Domain</i> (dominio de unión a glucógeno)
GFP:	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
GLUT1/2/4:	<i>Glucose transporter 1/2/4</i> (transportador de glucosa 1/2/4)
GP:	<i>Glycogen Phosphorylase</i> (glucógeno fosforilasa)
GPK:	<i>Glycogen Phosphorylase Kinase</i> (glucógeno fosforilasa quinasa)
GS:	<i>Glycogen Synthase</i> (glucógeno sintasa)
GSK3:	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i> (glucógeno sintasa quinasa 3)
GST:	<i>Glutathione-S-Transferase</i> (Glutación-S-Transferasa)
HA:	<i>Human influenza virus hemagglutinin epitope</i>

ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y SIGLAS

HCM:	<i>Hypertrophic cardiomyopathy</i> (cardiomiopatía hipertrófica)
HEK:	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
Hepes:	<i>N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]</i>
HIS3:	Gen que codifica para la <i>Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase</i> en levaduras (cataliza la sexta reacción en la biosíntesis de la histidina)
HMG-CoA:	3-Hidroxi-3-MetilGlutaril-CoA
HMGR:	3-Hidroxi-3-MetilGlutaril-CoA Reductasa
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSL:	<i>Hormone-Sensitive Lipase</i> (lipasa sensible a hormona)
IEF:	<i>Isoelectric focusing</i> (isoelectroenfoque)
IP:	Inmunoprecipitación
I3P	<i>Inositol-3-phosphate</i>
IPTG:	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
KD:	<i>Kinase Domain</i> (dominio quinasa)
kDa:	kiloDalton
L:	Litro
<i>lacZ</i> :	Gen que codifica para la enzima β -galactosidasa
LB:	Medio de cultivo Luria-Bertani
LEU2:	Gen que codifica para la <i>Beta-isopropylmalate dehydrogenase</i> en levaduras (cataliza la tercera reacción en la ruta de la biosíntesis de la leucina)
M:	Molar (moles/Litro)
MAP:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEF;	<i>mouse embrion fibroblast</i> (fibroblastos embrionarios de ratón)
mg:	Miligramo
min:	Minuto
mL:	Mililitro
MO25:	<i>Mouse protein 25</i>
mRNA:	<i>messenger ribonucleic acid</i> (RNA mensajero)
mU:	Miliunidad de actividad enzimática
myc:	<i>Avian myelocytomatosis virus epitope</i>
μ L:	Microlitro
NF- κ B:	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
ng:	Nanogramo
N-terminal:	Extremo amino-terminal
ONPG:	o-nitrofenil β -D-galactopiranosido
pb:	Pares de bases
PBS:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG:	Polietilenglicol
PEPCK:	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> (fosfoenol piruvato carboxiquinasa)

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

PFK2/FBPase2:	<i>Phosphofructokinase 2 / Fructose 2,6-bisphosphatase</i> (fosfofructoquinasa 2/fructosa 2,6-bifosfatasa)
pI:	Punto isoelectrico
PI 3-K:	<i>Phosphoinositide-3 Kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinasa)
PKA:	<i>Protein kinase A (cAMP-dependent protein kinase)</i>
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PP1/2A/2C:	<i>Protein phosphatase 1/2A/2C</i> (proteína fosfatasa de tipo 1/2A/2C)
p/v:	Peso/volumen
PVDF:	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RD:	<i>Regulatory Domain</i> (dominio regulador)
RING:	<i>Really Interesting New Group of Proteins domain</i>
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
RXR:	<i>Retinoid X Receptor</i> (receptor de retinoides X)
SC:	Medio de cultivo Sintético Completo
SDS-PAGE:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SNFI:	<i>Sucrose, Non-Fermenting 1</i>
STRAD:	<i>STE20-related adaptor protein</i>
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TBS:	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF α :	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
mTOR:	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
TRP1:	Gen que codifica para la <i>Phosphoribosylanthranilate isomerase</i> en levaduras (cataliza la tercera reacción en la biosíntesis del triptófano)
Tween-20:	<i>Polyoxyethylene sorbitan monolaurate</i>
UAS:	<i>Upstream Activation Sequence</i>
UDP-Glu:	Uridina-5'-difosfato-glucosa
URA3:	Gen que codifica para la <i>Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase</i> en levaduras (cataliza la sexta reacción enzimática en la biosíntesis <i>de novo</i> de las pirimidinas)
V:	Voltio
v/v:	Volumen/volumen
WPWS:	<i>Wolff-Parkinson-White Syndrome</i> (Síndrome Wolff-Parkinson-White)
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YNB:	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD:	<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose medium</i>
ZMP:	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-D-ribofuranosil-5'-monofosfato

ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y SIGLAS

Aminoácidos			Bases Nitrogenadas	
A	(Ala)	Alanina	A	Adenina
C	(Cys)	Cisteína	C	Citosina
D	(Asp)	Ácido aspártico	G	Guanina
E	(Glu)	Ácido glutámico	T	Timina
F	(Phe)	Fenilalanina		
G	(Gly)	Glicina		
H	(His)	Histidina		
I	(Ile)	Isoleucina		
K	(Lys)	Lisina		
L	(Leu)	Leucina		
M	(Met)	Metionina		
N	(Asn)	Asparagina		
P	(Pro)	Prolina		
Q	(Gln)	Glutamina		
R	(Arg)	Arginina		
S	(Ser)	Serina		
T	(Thr)	Treonina		
V	(Val)	Valina		
W	(Trp)	Triptófano		
Y	(Tyr)	Tirosina		

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La definición de ser vivo es tan compleja como la vida. Termodinámica y bioquímicamente, un sistema vivo es aquel que se mantiene alejado del equilibrio químico y el caos al ser atravesado por flujos de materia y energía que el mismo controla mediante una estructura y un metabolismo codificado en ácidos nucleicos los cuales actuarán como material hereditario.

En este sentido, todo organismo tiene sistemas y mecanismos moleculares capaces de aprovechar y regular los flujos que lo mantienen vivo. La evolución ha seleccionado aquellos mecanismos y sistemas (metabolismo) óptimos para el mantenimiento de la vida en un determinado entorno natural. A nivel molecular, una intrincada y, todavía, desconocida red de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos lleva a cabo las diferentes vías de canalización de estos flujos. La regulación de estas vías es clave para coordinar y definir un balance en las rutas y reacciones químicas que sustentan la vida. Esta coordinación y balance es llevado a cabo, casi siempre, por algunas proteínas clave que actúan como nodos sensores y efectores en esta red. Se desprende de ello que el conocimiento profundo de estos nodos y de su funcionamiento es clave para entender la vida y, por ende, para poder actuar contra enfermedades que se derivan de deficiencias, alteraciones, y funcionamientos anómalos de los componentes de esta red.

Una de estas proteínas nodo clave en la regulación del metabolismo energético, que está ampliamente conservada entre los eucariotas, es la proteína SNF1 en levaduras, cuyo ortólogo en mamíferos es AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Hardie et al., 1998). Esta proteína fue identificada por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuya principal fuente de carbono y energía es la glucosa. Cuando existe limitación de glucosa se da la desrepresión de genes que permiten a esta levadura usar otras fuentes de carbono como el etanol, glicerol o sacarosa. Los mutantes incapaces de crecer en sacarosa se denominaron *Snf* (*sucrose non-fermenting*). La proteína SNF1 es necesaria para la desrepresión de genes reprimidos por glucosa, esporulación, termo-tolerancia y almacenamiento de glucógeno. En mamíferos, AMPK fue descubierta en 1973 como una proteína quinasa capaz de inactivar por fosforilación dos enzimas: una enzima reguladora del metabolismo del colesterol, la (HMG)-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa) (Beg et al., 1973); y una enzima

INTRODUCCIÓN

reguladora del metabolismo de ácidos grasos, la ACC1 (acetil-CoA carboxilasa 1) (Carlson and Kim, 1973). En la década de los ochenta se definió que AMPK está regulada alostéricamente por AMP. (Revisado en (Hardie et al., 1998)).

En la última década, AMPK ha sido descrita como sensor central del estatus energético celular. Es una proteína quinasa de serina/treonina implicada en la regulación del metabolismo de glucosa, lípidos, y proteínas. AMPK está implicada también en la regulación de la transcripción génica, en el control del crecimiento, ciclo celular, y apoptosis. Y, en eucariotas superiores, se ha visto involucrada en el control sistémico a través de la regulación hormonal y de citoquinas. AMPK es, por tanto, un regulador clave, que se ha demostrado crucial para la comprensión y el tratamiento de enfermedades como la obesidad, la diabetes, el síndrome metabólico y algunas enfermedades de índole cardíaca.

I) AMPK

AMPK es un complejo proteico heterotrimérico con actividad quinasa de serina y treonina. Está compuesto por una subunidad α , una β y γ . La subunidad AMPK α es la subunidad catalítica, y presenta dos isoformas, $\alpha 1$ y $\alpha 2$; también la subunidad AMPK β presenta dos isoformas, $\beta 1$ y $\beta 2$; la subunidad AMPK γ tiene tres isoformas, $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$. Tanto AMPK β como AMPK γ son subunidades reguladoras del complejo AMPK. Todas ellas presentan ortólogos a lo largo del reino eucariota, y están muy conservadas desde levaduras hasta humanos (Hardie et al., 2006; Sanz, 2008; Witczak et al., 2008).

Las tres subunidades son necesarias para la formación de un complejo estable y totalmente funcional. La composición predominante del heterotrímero es dependiente de tejido. Así, el trímero de AMPK $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ es el más extendido entre la mayoría de tipos celulares (Hardie and Sakamoto, 2006). Sin embargo, en músculo esquelético humano la forma predominante

es $\alpha 2\beta 2\gamma 1$, aunque se da una variación en el balance de trímeros $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ - $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ - $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ en diferentes situaciones de ejercicio (Jensen et al., 2009; Jorgensen et al., 2006; Wojtaszewski et al., 2005). Esta composición diferencial facilita la ejecución de las diferentes funciones fisiológicas en las que AMPK presenta un papel regulador principal.

La subunidad AMPK α presenta la actividad catalítica quinasa en la región N-terminal, en su dominio quinasa (KD; *kinase domain*), mientras que en la región C-terminal presenta un dominio regulador (RD, *regulatory domain*) (Figura 1). AMPK β actúa como andamiaje del complejo trimérico determinando especificidad y localización subcelular. AMPK β presenta un dominio de unión a glucógeno (GBD; *glycogen binding domain*) y en su parte C-terminal un dominio de unión a α y γ (ASC; *association with Snf1 complex*) (Figura 1). La subunidad AMPK γ presenta cuatro repeticiones en tándem descritas inicialmente en la enzima cistationina β -sintasa (CBS), que forman, agrupándose dos a dos, los dominios de Bateman, capaces de unir AMP, y claves en la regulación de AMPK (Sanz, 2008; Witczak et al., 2008) (Figura 1).

La actividad de AMPK está regulada por fosforilación del residuo de treonina 172 de la subunidad α . Esta fosforilación es llevada a cabo por otras quinasas, y modulada por la unión de AMP a los dominios de Bateman (Witczak et al., 2008).

1 Estructura y localización subcelular de AMPK

1.1 AMPK α : estructura y localización subcelular

Ambas isoformas de AMPK α presentan un peso aproximado de 63kDa. AMPK $\alpha 1$ tiene 548 aa y AMPK $\alpha 2$ 552aa y están codificadas por los genes PRKAA1 y PRKAA2 respectivamente. Su dominio quinasa (KD) se extiende entre los residuos 1 y 312; el dominio regulador (RD) abarca la región C-terminal a partir del residuo 313. El ortólogo en *Saccharomyces cerevisiae*, Snf1, presenta 633aa con KD entre los residuos 1 y 391 y RD a partir del residuo 392 (Figura 1).

INTRODUCCIÓN

El dominio quinasa (KD) está muy conservado evolutivamente. Su actividad catalítica es dependiente de la fosforilación del residuo treonina 172. En ausencia de fosforilación, el KD interacciona con una región inhibitoria (residuos 313-392) (AID; *autoinhibitory domain*) dentro del RD (Figura 1). Por esto, formas truncadas de AMPK α que carecen del RD presentan actividad constitutiva después de ser fosforiladas en la treonina 172 o cuando esta treonina es reemplazada por ácido aspártico (T172D) o glutámico (T172E) (Sanz, 2008). La cadena lateral de aspártico y glutámico, que posee carga negativa, mimetiza la carga negativa introducida por la fosforilación. El RD muestra menor conservación evolutiva, y además del AID, presenta una región (aa 397-aa 552) esencial para la interacción de AMPK α con AMPK β y AMPK γ (Witczak et al., 2008) (Figura 1).

La localización subcelular en células de mamífero de la subunidad AMPK α parece ser dependiente de isoforma. Así, AMPK α 1 se ha encontrado en fracciones no nucleares, y AMPK α 2 es predominantemente nuclear, aunque también está presente en menor medida en fracciones citoplasmáticas (Towler and Hardie, 2007; Witczak et al., 2008). Asimismo se ha observado que la localización subcelular de AMPK α puede variar dependiendo de la situación metabólica. En células de músculo esquelético humano se ha demostrado que AMPK α 2 se transloca al núcleo tras 60 minutos de ejercicio. Por otro lado, en células HeLa, AMPK α 1 y AMPK α 2 translocan al núcleo tras la inducción de estrés por tratamiento con deoxiglucosa (Witczak et al., 2008).

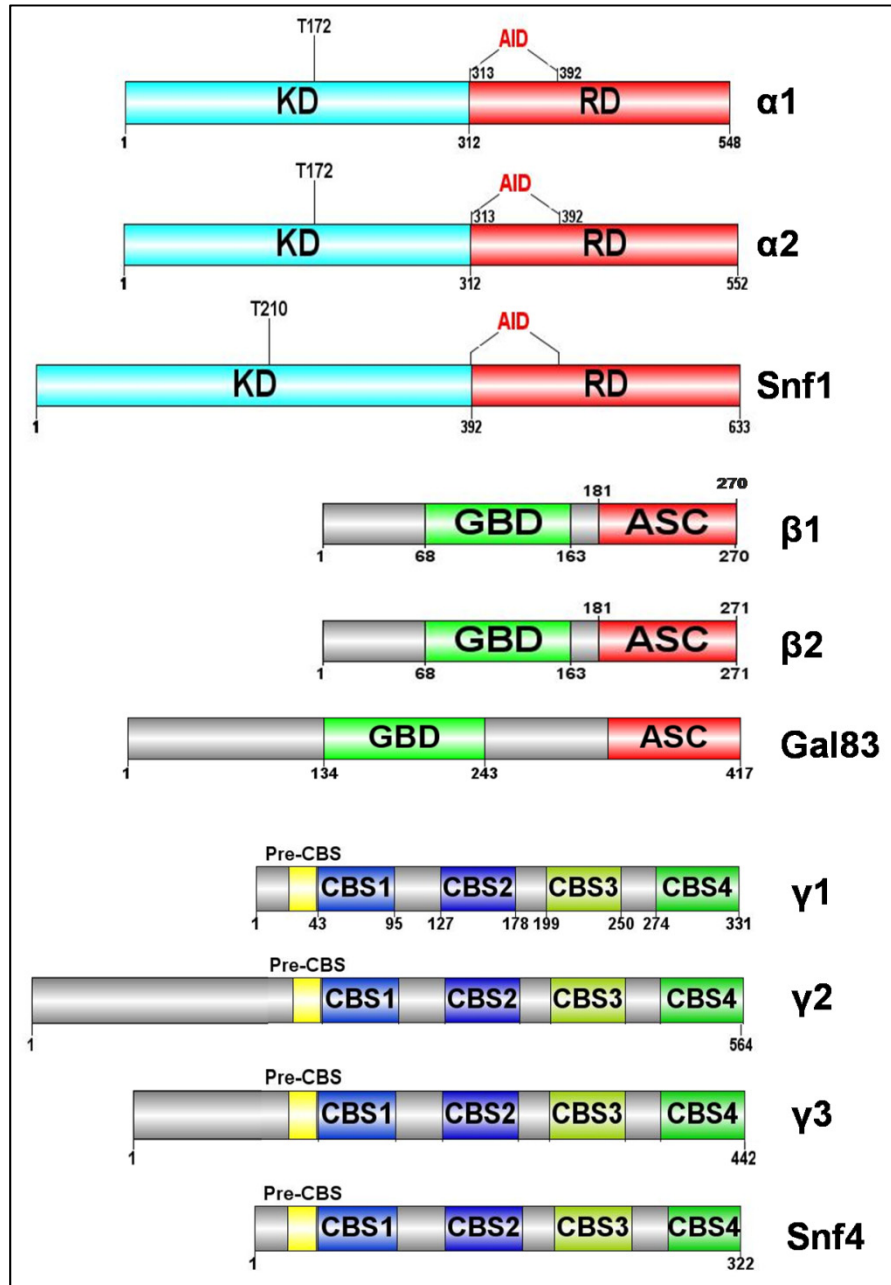


Figura 1. Estructura y dominios de las subunidades de AMPK y SNF1.

INTRODUCCIÓN

1.2 *AMPK β : estructura y localización subcelular*

AMPK β también presenta dos isoformas, AMPK β 1 con 270 aa (movilidad electroforética a 38 kDa) y AMPK β 2 con 271 aa (movilidad electroforética a 34 kDa), codificadas en los genes PRKAB1 Y PRKAB2 respectivamente. Ambas presentan un 71% de homología y solo difieren en el extremo N-terminal. AMPK β tiene un dominio de unión a glucógeno (GBD) y un dominio de asociación con el complejo SNF1 (ASC). Estos dos dominios también se hallan en los 3 ortólogos existentes en *Saccharomyces cerevisiae*, denominados Gal83, Sip1 y Sip2 (Hardie et al., 1998; Sanz, 2008) (Figura 1).

El dominio GBD ocupa los residuos 68 a 163, y parece no esencial para el ensamblaje, actividad y regulación del heterotrímero (Sanz, 2008). No obstante, trabajos más recientes sugieren que, al menos *in vitro*, se da una regulación negativa de la actividad de AMPK en presencia de glucógeno mediada por el dominio GBD (McBride et al., 2009).

El dominio ASC ocupa la región C-terminal de AMPK β a partir del residuo 181, y se ha demostrado imprescindible para la formación, estabilización y función del complejo trimérico. La misión del ASC es servir de anclaje a AMPK α y AMPK γ (Sanz, 2008; Witczak et al., 2008).

Por otro lado, ambas isoformas de AMPK β sufren miristoilación en la glicina 2. Esta modificación post-traducciona permite la localización de AMPK β en membranas (Witczak et al., 2008), y su eliminación genera una distribución intracelular de AMPK β mucho más homogénea, así como un incremento de la actividad de AMPK (Sanz, 2008).

AMPK β también sufre fosforilación de determinados residuos. AMP β 2 es fosforilada en la serina 108 y 182, y AMPK β 1, además, en las serinas 24 y 25 (Sanz, 2008; Witczak et al., 2008). Esto tiene consecuencias a nivel funcional y de localización. Ambas isoformas se distribuyen por núcleo y citoplasma. Sin embargo, la fosforilación de AMPK β 1 en serina 24, 25 y 182 evita su presencia en el núcleo y la fosforilación en serina 108 incrementa la actividad de AMPK (Sanz, 2008). Se ha observado igualmente, que tras situaciones estresantes, las dos isoformas translocan al núcleo (Witczak et al., 2008).

1.3 *AMPK γ : estructura y localización subcelular*

Las subunidades de AMPK γ están codificadas en los genes PRKAG1, 2 y 3. Las subunidad AMPK γ 1 tiene 331 aa (37 kDa), AMPK γ 2 564 aa (63 kDa) y AMPK γ 3 492 aa (55 kDa). La región N-terminal no está conservada en ninguna de ellas. La región C-terminal presenta cuatro repeticiones CBS, muy conservadas desde su ortólogo en *Saccharomyces cerevisiae* denominado SNF4, que tiene 322 aa (36kDa) (Sanz, 2008) (Figura 1).

Las repeticiones CBS se agrupan por parejas: CBS1-CBS2 y CBS3-CBS4, generando los denominados dominios de Bateman, que son capaces de unir tanto nucleótidos de adenina como AMP y ATP (Sanz, 2008; Witczak et al., 2008). La unión de AMP o ATP a los dominios de Bateman es altamente cooperativa (Hardie and Sakamoto, 2006). La afinidad de unión de AMP es mucho mayor que la de ATP, y su unión es mutuamente excluyente (Hardie et al., 2006; Hardie and Sakamoto, 2006). La afinidad de unión de AMP de las diferentes isoformas varía. La afinidad por AMP de AMPK γ 1 es mayor que la de AMPK γ 2 y AMPK γ 3 (Sanz, 2008).

Los 25 aa anteriores al primer dominio CBS (Pre-CBS) están implicados en la interacción con β y en la formación de un complejo AMPK activo y estable. Además, las subunidades AMPK γ , sufren acetilación N-terminal, sin función descrita (Sanz, 2008).

La distribución subcelular de AMPK γ es tanto nuclear como citoplásmica. No obstante, la isoforma AMPK γ 1 parece presentar una localización nuclear más acentuada que las otras dos isoformas (Witczak et al., 2008).

2 Regulación molecular de la actividad de AMPK

2.1 *Activación de AMPK*

La activación de AMPK esta mediada por la unión cooperativa y de alta afinidad del AMP a los dominios de Bateman de la subunidad AMPK γ . AMPK es un sensor del estado energético celular, dado que es activada por elevadas relaciones AMP/ATP, que se generan tras el consumo de ATP por

INTRODUCCIÓN

algún tipo de estrés o privación nutricional. En un estado normal, las células tienen una relación AMP/ATP muy baja; cuando el consumo de ATP supera su síntesis, la relación ADP/ATP aumenta y la reacción catalizada por la adenilato quinasa ($2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$) se desplaza a la derecha, haciendo que la variación en el AMP sea mucho más drástica que la de ADP (Hardie and Hawley, 2001). Ello hace que AMPK sea extremadamente sensible a las variaciones en el estado energético de la célula.

El AMP activa AMPK por dos vías. Por un lado, mediante un mecanismo alostérico que induce un cambio conformacional en el heterotrímero AMPK aumentando su actividad. Por otro lado, la unión de AMP, hace que AMPK sea un peor sustrato para sus fosfatasas específicas (Figura 2). Ambos efectos son antagonizados por ATP que, a elevadas concentraciones, compite con el AMP por los dominios de Bateman (Hardie et al., 2006; Sanz, 2008; Witczak et al., 2008).

La activación total del trímero AMPK se da tras la fosforilación del residuo treonina 172 (T172) situado en el dominio catalítico de la subunidad AMPK α (Figura 1). Existen formas mutantes de AMPK α que presentan cambio de treonina 172 a alanina (T172A) que son constitutivamente inactivas porque no pueden ser fosforiladas, aunque sí forman un heterotrímero normal. Los mutantes que presentan cambio de treonina 172 a ácido aspártico (T172D) son constitutivamente activos (teniendo aproximadamente el 50% de la actividad catalítica), dado que su cadena lateral mimetiza la carga negativa introducida por la fosforilación, y no pueden ser inactivados por acción de las fosfatasas. (Sanz, 2008).

En *Saccharomyces cerevisiae* el ortólogo de AMPK, SNF1 también está regulado por fosforilación, pero sobre la treonina 210 de la subunidad Snf1, que es equivalente a la treonina 172 de AMPK α de mamíferos.

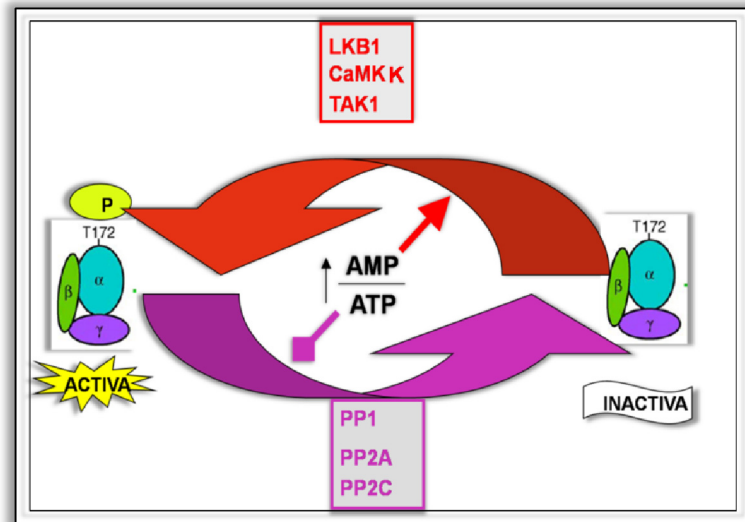


Figura 2. Esquema de activación de AMPK.

2.1.1 Quinasas de AMPK

La fosforilación en T172 y la consecuente activación de AMPK esta mediada por quinasas como LKB1, CaMKK α , CaMKK β y TAK1, que se exponen a continuación.

LKB1 es la principal quinasa que actúa sobre AMPK, sobre todo en músculo esquelético e hígado (Sanz, 2008). Es una serina-treonina quinasa que presenta homología de secuencia y estructura con tres quinasas de *Saccharomyces cerevisiae*, Elm1, Pak1 y Tos3, que actúan sobre SNF1 (Witczak et al., 2008). En mamíferos, LKB1 forma un complejo ternario con otras dos proteínas, STRADA α/β y MOD25 α/β . Solo cuando LKB1 forma parte de este complejo ternario está estabilizada y es capaz de activar a AMPK por fosforilación del residuo treonina 172 de la subunidad AMPK α . En un principio parecía que LKB1 solo actuaba como quinasa de AMPK cuando la relación AMP/ATP era elevada (Sanz, 2008; Witczak et al., 2008), ya que, células que carecen de LKB1 de manera natural como las células HeLa, o mutantes de delección de LKB1 en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF; *mouse embryonic fibroblast*) no presentaban activación de AMPK en situaciones

INTRODUCCIÓN

de aumento del ratio AMP/ATP (Sanz, 2008). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la actividad LKB1 es insensible a las variaciones de AMP (Witczak et al., 2008).

CaMKK (*Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein kinase kinase*) presenta dos isoformas con un 70% de homología de secuencia aminoacídica, CaMKK α y CaMKK β . Aunque se ha observado la expresión muscular de CaMKK α (Witczak et al., 2008), las CaMKK se expresan principalmente en tejido neuronal, y responden a incrementos en la concentración de Ca²⁺ intracelular tras la despolarización de la membrana para la conducción del impulso nervioso, que no altera la relación AMP/ATP. Se ha observado que el aumento de Ca²⁺ en células deficientes en LKB1 produce la activación de AMPK por fosforilación de la treonina 172, y que esta activación es impedida por inhibidores de las CaMKK como STO-609 y siRNA de CaMKK β (Sanz, 2008).

TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase 1*) se activa por autofosforilación tras la unión de TAB1; (*TAK1-binding protein 1*) y es capaz de fosforilar AMPK α en la treonina 172. En mamíferos, se expresa en varios tejidos incluido el músculo esquelético, y es activada por citoquinas y también por agentes químicos que aumentan la relación AMP/ATP. En músculo cardiaco carente de TAK1, el tratamiento con metformina no tiene efecto sobre la fosforilación de AMPK (Witczak et al., 2008). El tratamiento con citoquinas de células HeLa o la sobreexpresión de TAK1 y TAB1 induce la fosforilación de la treonina 172 de AMPK (Momcilovic et al., 2006).

2.2 Inactivación de AMPK

Como se ha señalado anteriormente, la actividad de AMPK es dependiente de la fosforilación de la treonina 172, y por tanto, su desfosforilación inactiva a AMPK. En levadura, las quinasas Elm1, Pak1 y Tos3 tienen actividad constitutiva, y por tanto la regulación de la actividad de SNF1 recae principalmente en la desfosforilación de la treonina 210 por la fosfatasa Glc7. Glc7 es el ortólogo de PP1 (*protein phosphatase 1*) de mamíferos, y actúa sobre SNF1 unida a su subunidad reguladora Reg1. La ausencia de Reg1 hace que el complejo SNF1 este constitutivamente activo (Sanz, 2008). En el caso de células de mamífero, parece que la unión de AMP a la subunidad AMPK γ en el trímero AMPK dificulta el acceso de las fosfatasas

al sitio treonina 172 de AMPK α (Sanders et al., 2007b; Sanz, 2008; Witczak et al., 2008). En experimentos *in vitro* se ha visto que las fosfatasas PPI, PP2A, y PP2C son capaces de desfosforilar la treonina 172 (Sanz, 2008). No obstante, esto no ha sido demostrado de manera directa *in vivo*.

2.3 Estabilidad de AMPK

La regulación de la estabilidad de las subunidades de AMPK podría ser un modo adicional de regulación sobre su actividad. En este sentido ya había sido observado que la sobreexpresión de las tres subunidades de AMPK de manera conjunta hacía que AMPK α presentase una vida media de alrededor de 13 horas, mientras que si se sobreexpresaba en solitario, la vida media era solo de aproximadamente 6 horas (Crute et al., 1998).

Por otro lado, se ha visto que AMPK α endógena de MEFs esta poliubiquitinada, y que esta poliubiquitinación no se ve alterada en presencia o ausencia de AICAR, phenformina o A-769662 (Al-Hakim et al., 2008). Aunque no se ha determinado el tipo y cuál es la función de esta poliubiquitinación, sí que es probable que su presencia module la interacción entre las subunidades, la actividad y la estabilidad del complejo AMPK.

Adicionalmente, algunos trabajos recientes señalan a Cidea, una proteína de la familia CIDE (*cell death inducing DFF45-like effector*) (Gong et al., 2009), como posible regulador de la estabilidad de AMPK en tejido adiposo. Cidea actúa promoviendo la ubiquitinación y degradación proteasomal de las tres subunidades de AMPK mediante su interacción con AMPK β (Qi et al., 2008). En ratones carentes de Cidea, tanto la cantidad, como la actividad del trímero AMPK se encuentran aumentadas. Esto tiene como consecuencia un aumento de la fosforilación de ACC y un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos lo que conlleva a que los ratones tengan menos grasa (Qi et al., 2008). Como Cidea no es una ubiquitina ligasa, se ha propuesto que Cidea podría funcionar como adaptador reclutando ubiquitina ligasas celulares para promover la degradación de AMPK.

INTRODUCCIÓN

3 Eventos moduladores del estado de activación de AMPK

3.1 *Eventos fisiológicos*

En las células y tejidos de mamífero la actividad de AMPK esta modulada por estímulos como el ejercicio (contracción muscular), ciertos ligandos extracelulares, (factores de crecimiento, citoquinas y hormonas), y estrés (isquémico, hipóxico, térmico, osmótico, oxidativo y privación de nutrientes). Todos estos estímulos afectan al estatus energético celular de diferentes modos, y AMPK actúa como sensor-efector para restaurar el balance energético y metabólico.

3.1.1 *Ejercicio y contracción muscular*

En el caso de la contracción muscular, la actividad de AMPK se ve incrementada probablemente por la acción concomitante de varios eventos: la elevación del Ca^{2+} intracelular necesario para la contracción muscular, la elevación de la relación AMP/ATP por el gasto energético derivado de la misma, la acción de ciertas citoquinas como la interleucina 6, que estimula la fosforilación de la treonina 172 de AMPK α en músculo esquelético por mecanismo desconocido (Witczak et al., 2008), y la generación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la respiración mitocondrial combinadas con hipoxia (Emerling et al., 2009). No obstante, no está claro si todos o solo algunos de estos estímulos contribuyen en la activación de AMPK durante la contracción muscular.

3.1.2 *Ligandos extracelulares*

Los ligandos extracelulares en la regulación de AMPK adquieren su mayor importancia en organismos pluricelulares, donde es necesario coordinar los requerimientos energéticos y metabólicos en todos los tejidos del organismo para conseguir una respuesta conjunta integrada.

Algunos de ellos son ligandos que se unen a receptores acoplados a proteínas G, que funcionan unidos a cascadas de señalización de inositol trifosfato (I3P), liberando Ca^{2+} en el citosol y actuando mediante CaMKK (Towler and Hardie, 2007). La mayoría de estos ligandos extracelulares son hormonas y citoquinas de efecto pleiotrópico, cuya acción sobre AMPK suele ser dependiente de tejido, con un mecanismo de acción variado y en

INTRODUCCIÓN

muchos casos desconocido. El efecto de algunas de ellas sobre AMPK en diferentes tejidos queda recogido en la **Tabla 1**. Así por ejemplo, la leptina tiene función reguladora del apetito, del gasto energético corporal y neuroendocrina. Esta hormona, en músculo esquelético e hígado activa AMPK, pero la inhibe en hipotálamo y en músculo cardíaco (Kola et al., 2006). La adiponectina aumenta la relación AMP/ATP permitiendo la fosforilación de la treonina 172 de AMPK α , y controla el metabolismo de glucosa y ácidos grasos incrementando la β -oxidación. La resistina, otra hormona adipocítica, tiene el efecto opuesto a la adiponectina (Sanz, 2008). La insulina por su parte, inhibe la actividad de AMPK sin modular la relación AMP/ATP (Sanz, 2008). Esto ocurre mediante la vía PI3K/Akt: Akt fosforila la serina 485 de AMPK α 1 y la serina 491 de AMPK α 2, y con ello disminuye la fosforilación de la treonina 172 de AMPK α (Kovacic et al., 2003).

Tabla 1. Efecto de hormonas y citoquinas sobre la actividad de AMPK en diferentes tejidos. Modificado de (Kola et al., 2006).

Ligando	Músculo esquelético	Músculo cardíaco	Tejido adiposo	Hígado	hipotálamo
Leptina	aumenta	disminuye		aumenta	disminuye
Insulina	mantiene	disminuye	disminuye		disminuye
Adiponectina	aumenta	aumenta	aumenta	aumenta	
Glucagón				aumenta	
Noradrenalina			aumenta		
Ácido lipoico	aumenta	aumenta			disminuye
Resistina	disminuye			disminuye	
Interleukina 6	aumenta		aumenta	mantiene	

3.1.3 Estrés y activación de AMPK

Los diferentes tipos de estrés enumerados anteriormente (isquémico, hipóxico, térmico, osmótico, oxidativo y privación de nutrientes) suelen cursar con la activación de AMPK y, a excepción del osmótico, que actúa vía CaMKK (Sanz, 2008), todos parecen cursar con un aumento de la relación AMP/ATP (Hardie and Sakamoto, 2006; Kahn et al., 2005). Sin embargo, trabajos recientes indican que la activación de AMPK en condiciones de hipoxia, es independiente de la relación AMP/ATP, y está

INTRODUCCIÓN

mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), que también son generadas por estrés oxidativo (Emerling et al., 2009). Por otro lado, el estrés oxidativo generado por el agua oxigenada (H_2O_2), activa AMPK mediante fosforilación de treonina 172 de AMPK α , y algunos trabajos señalan que esto se da por aumento de la relación AMP/ATP (Sanz, 2008). En muchos casos el estrés es producido por compuestos exógenos como fármacos o venenos, que serán tratados de manera extensa en el punto siguiente.

Un caso de particular interés en la regulación de AMPK, es su regulación por glucosa. Como sucede en levaduras con el ortólogo de AMPK, SNF1, la privación de glucosa produce la activación de esta quinasa (Hardie et al., 2006). No obstante, el mecanismo de activación de AMPK por privación de glucosa no está claro. En principio, la privación de nutrientes produciría una depleción en el suministro de ATP lo que incrementaría la relación AMP/ATP con la consecuente activación de AMPK (Hardie and Sakamoto, 2006). Sin embargo, algunos trabajos señalan que la activación de AMPK por privación de glucosa se da por mecanismos independientes de la relación AMP/ATP (Sanz, 2008). De cualquier modo, la regulación de AMPK por glucosa en células eucariotas de organismos superiores es más compleja. Aunque la glucosa regula la actividad de AMPK en muchos tejidos, es de especial importancia en células como las células β -pancreáticas e hipotalámicas, que son capaces de sentir los cambios en los niveles de glucosa en la sangre gracias a que presentan transportadores de glucosa de baja afinidad como GLUT2 (Towler and Hardie, 2007).

3.2 *Eventos farmacológicos activadores*

Para la comprensión del funcionamiento de AMPK, así como para el tratamiento de enfermedades como la diabetes de tipo 2, se han usado gran variedad de fármacos. Estos compuestos que aumentan la actividad AMPK se pueden dividir en dos grandes grupos, los que incrementan la relación AMP/ATP y los que no. Además de estos fármacos, de manera más reciente se han empezado a estudiar con más profundidad algunos compuestos naturales cuya actividad sobre AMPK puede ser importante. Algunos de ellos se detallan a continuación.

3.2.1 *Compuestos químicos que aumentan la relación AMP/ATP*

AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida 1- β -D-ribofuranosido). Este activador de AMPK, ampliamente usado en el estudio de AMPK, actúa mimetizando la acción del AMP. AICAR es transportado al interior celular por el transportador de adenosina; una vez en el interior es transformado por la adenosina quinasa en ZMP (Witczak et al., 2008), análogo no metabolizable del AMP. La activación de AMPK con AICAR se produce a tiempos cortos con un aumento considerable de la fosforilación de la treonina 172 de AMPK α , ya que a tiempos largos se acumula ZTP que mimetiza ATP, inhibiendo AMPK. Por otro lado, hay que tener precaución con el uso de este producto ya que actúa sobre otras enzimas sensoras de AMP, como la glucógeno fosforilasa y la fructosa 1,6-bisfosfatasa, o sobre el metabolismo de la adenosina (Sanz, 2008).

Toxinas mitocondriales. Venenos metabólicos como el dinitrofenol, rotenona y cianuro de potasio, que afectan al funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial produciendo un descenso en la producción de ATP (aumenta AMP/ATP), son activadores de AMPK. El dinitrofenol es un ionóforo que deshace el gradiente de protones, lo que detiene la generación de ATP por la cadena respiratoria (Witczak et al., 2008). La rotenona y el cianuro actúan como inhibidores de algunos de los complejos transportadores de la cadena, lo que hace que descienda la cantidad de ATP (Sanz, 2008; Witczak et al., 2008).

TZD (thiazolidinediones). Algunos de ellos como la rosiglitazona o pioglitazona reducen la glucosa en sangre de humanos y ratones diabéticos a través de la activación de AMPK en músculo esquelético, y son usados para tratar la diabetes de tipo 2 (Witczak et al., 2008). Parece que ejercen su acción a través del aumento de la relación AMP/ATP por inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Sanz, 2008).

3.2.2 *Compuestos químicos que NO aumentan la relación AMP/ATP*

Metformina. Es otro de los fármacos usados frecuentemente en el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Esta biguanida activa AMPK por fosforilación de la treonina 172 de AMPK α a tiempos cortos. Su mecanismo

INTRODUCCIÓN

bioquímico no está claro todavía. Algunos trabajos indican que actúa mediante aumento en la relación AMP/ATP por inhibición del complejo I mitocondrial; en otros que esta inhibición no afecta a la relación AMP/ATP y que tampoco se ven afectadas actividades de LKBI, fosfatasas, ni los niveles de Ca^{2+} intracelulares (Witczak et al., 2008). En este sentido se ha observado que la activación de AMPK por metformina podría depender de la presencia de especies reactivas de nitrógeno (RNS: *reactive nitrogen species*), dado que la sobreexpresión de superóxido dismutasa y la inhibición de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS: *endotelial nitric- oxide synthase*) evitan la activación de AMPK por metformina (Sanz, 2008). La acción de metformina sobre AMPK *in vivo* requiere de la ruta PI3 quinasa/Scr. Aunque la actividad de LKBI no se ve afectada por metformina, tanto LKBI en músculo esquelético (Sanz, 2008), como TAKI en músculo cardíaco (Witczak et al., 2008), son requeridas para la acción de la metformina sobre AMPK. Otra biguanida, denominada **phenformina**, sí aumenta la relación AMP/ATP, y tiene un efecto mucho más rápido sobre AMPK (Witczak et al., 2008), pero no es usada como antidiabético porque produce acidosis láctica.

A-769662. Se trata de una pequeña molécula hallada en una búsqueda de activadores químicos de AMPK en ensayos libres de células y hepatocitos primarios. El A-769662 presenta una potente y reversible capacidad de activación de AMPK (Cool et al., 2006). El mecanismo molecular por el que A-769662 activa AMPK no está mediado por el aumento en la relación AMP/ATP, ni tampoco parece unirse a la subunidad AMPK γ como lo haría el AMP, ya que en presencia de mutantes de AMPK γ que no pueden unir AMP, A-769662 sigue activando AMPK (Sanders et al., 2007a). A-769662 activa AMPK de manera alostérica y también por inhibición de la desfosforilación de la treonina 172 de AMPK α . La falta del dominio GBD en AMPK β impide la activación alostérica de AMPK por A-769662. La mutación de la serina 108 de AMPK β impide completamente la activación de AMPK por A769662 (Sanders et al., 2007a). Parece ser que A-769662 no tiene efecto sobre AMPK α aislada o en presencia del GBD de AMPK β y que solo actúa activando el heterotrímero AMPK. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEF: *mouse embryonic fibroblasts*) dobles mutantes para las subunidades AMPK $\alpha 1$ y AMPK $\alpha 2$ ($\alpha 1^{-/-}$ y $\alpha 2^{-/-}$), A-769662 no tiene efecto en la fosforilación de ACC, lo cual es un indicador de su

especificidad como activador de AMPK (Goransson et al., 2007). Esta especificidad quedo confirmada cuando su acción fue medida sobre 76 quinasas, algunas de la familia de AMPK, a concentraciones de A-769662 diez veces superiores a las saturantes para AMPK. En todos los casos, A-769662 presentaba un efecto activador casi despreciable sobre las quinasas ensayadas (Goransson et al., 2007).

3.2.3 *Compuestos naturales*

Existen de manera natural, algunos compuestos químicos procedentes de ciertas plantas, cuyos efectos metabólicos beneficiosos están siendo estudiados recientemente. Muchos de ellos presentan actividad antidiabética y anticancerígena, aunque sus mecanismos de acción no están del todo definidos. Algunas de estas sustancias químicas naturales presentan probada acción sobre la actividad de AMPK, a la vez que actúan sobre la actividad proteasomal, que es la principal ruta de degradación proteica intracelular y una de las dianas primordiales en el tratamiento de los diferentes cánceres. Algunos ejemplos de estos productos son Berberina (usada en la medicina tradicional china, procedente de plantas del género *Berberis*), EGCG (*epigallocatechin-3-gallate*, procedente del té verde), Genisteína (polifenol derivado de la soja), y Resveratrol (presente en las uvas y el vino tinto).

Berberina. Este compuesto, que presenta propiedades anti-inflamatorias, anti-parasíticas y anti-bacterianas (Cheng et al., 2006), reduce el peso corporal y aumenta la tolerancia a la glucosa sin alterar el apetito en ratones diabéticos. En ratas con dieta grasa, reduce el peso corporal, la lipemia sanguínea y aumenta la acción insulínica. El tratamiento con berberina activa AMPK en células adipocíticas 3T3-L1 y miotubos L6, lo que se deriva en un aumento del transportador de glucosa GLUT4 en membrana de células L6 y una reducción de la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. (Lee et al., 2006). La acción de la berberina en la reducción de glucosa sanguínea implica la activación de las rutas AMPK y p38 MAPK, ya que provoca la fosforilación de AMPK y p38 MAPK, mientras que el tratamiento con compuesto C (inhibidor de AMPK) y SB202190 (inhibidor de p38 MAPK) la inhiben. La acción de la berberina está mediada por el incremento de la relación AMP/ATP (Cheng et al., 2006). Posiblemente a

INTRODUCCIÓN

través de un efecto sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Turner et al., 2008).

EGCG. El tratamiento de células de carcinoma hepático humano (HepG2) con EGCG, disminuye el bloqueo de la señalización por insulina inducido por altas concentraciones de glucosa, a través de la activación de AMPK (Lin and Lin, 2008). Por otro lado, el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con EGCG estimula la liberación endógena de ROS, la cual activa AMPK y a su vez inhibe la diferenciación a adipocitos maduros (Hwang et al., 2005). En esta misma línea, el tratamiento de células de cáncer de colon quimiorresistentes con EGCG inhibe la expresión de COX2 (ciclooxigenasa 2) y promueve la expresión de proteínas pro-apoptóticas como p53 y PARP mediante la activación de AMPK por ROS. El uso de EGCG junto a otros quimioterápicos como el etopóxido y el 5-fluorouracilo implementa su actividad anticancerígena (Hwang et al., 2007). También existen indicios sobre la capacidad de EGCG para inhibir en cierta medida la actividad proteasomal, la cual cursa con el incremento de proteínas supresoras de tumores como p27 y IκBα que detienen las células tumorales en fase G1, y que casi no tienen efecto en células normales (Kristin et al., 2006).

Genisteína. El tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con genisteína inhibe su proceso de diferenciación a adipocitos maduros, y además, promueve la apoptosis en estos últimos. Igual que sucedía con EGCG, la genisteína actúa mediante la liberación endógena de ROS, y la activación concomitante de AMPK (Hwang et al., 2005). Algunos trabajos también señalan que la genisteína presenta actividad inhibitoria del proteasoma y que potencia la actividad de algunos anticancerígenos ampliamente usados (Kristin et al., 2006).

Resveratrol. Este polifenol presenta propiedades anti-inflamatorias, cardioprotectoras, y anti-cancerígenas. A estos efectos se suman propiedades anti-diabéticas. El resveratrol incrementa la toma de glucosa en células musculares C2C12 mediante la activación de AMPK. Además, en presencia de resveratrol, se potencia el efecto de la insulina en la toma de glucosa por activación de la ruta PI-3 quinase/Akt (Park et al., 2007). El resveratrol también activa AMPK en cerebro y en células neuronales primarias (Neuro2a) estimulando el crecimiento de neuritas y le biogénesis mitocondrial. Resveratrol estimula la actividad de AMPK en

neuronas mediante LKBI (Dasgupta and Milbrandt, 2007). Las propiedades anti-cancerígenas del resveratrol recaen principalmente en su actividad potenciadora del efecto de quimioterápicos usados en diferentes tipos de cáncer. Su modo de acción no está definido, pero hay indicios de que su actividad potenciadora podría estar mediada por inhibición del proteasoma, ya que detiene el ciclo celular en fase S en células de cáncer de pulmón (Kristin et al., 2006).

3.3 *Eventos farmacológicos inactivadores*

La inhibición farmacológica de AMPK es compleja. Muestra de ello es la escasez de compuestos hallados para este fin. La mayoría presentan baja especificidad y afectan a otras rutas y quinasas. De todos ellos, los más usados son el compuesto C y el inhibidor C75, aunque también presentan múltiples efectos secundarios no dependientes de la inhibición de AMPK. El **compuesto C** es una pirrazolopirimidina que actúa como inhibidor reversible de AMPK, mimetizando la acción del ATP. No obstante, este producto químico tiene efecto inhibitorio sobre el transportador de adenosina (indispensable para la acción de AICAR), y otra gran cantidad de quinasas (Witczak et al., 2008). Ello hace que su uso sea muy restringido, ya que sus efectos son difíciles de atribuir únicamente a AMPK. El inhibidor **C75** actúa inhibiendo la ácido graso sintasa, y activando la oxidación de ácidos grasos, lo que deriva en un aumento de los niveles de ATP, que inhiben AMPK (Sanz, 2008).

3.4 *Uso de mutantes en la regulación de AMPK*

Dada la gran variedad de efectos inespecíficos en la modulación de la actividad de AMPK que producen los fármacos y compuestos naturales, el estudio de AMPK se ha servido del uso de formas mutantes de AMPK constitutivamente activas o inactivas.

Formas constitutivamente activas. La actividad catalítica de AMPK se encuentra en la subunidad AMPK α . Como ya se mencionó anteriormente, en la forma inactiva no fosforilada de AMPK α , el dominio quinasa interacciona con la región autoinhibidora (AID; residuos 313-392) dentro del RD (**Figura 1**). Por ello, se han construido formas cortas de las subunidades AMPK α conteniendo sólo el dominio quinasa (KD; residuos 1-

INTRODUCCIÓN

312) y se han usado como formas constitutivamente activas de la enzima. Estas formas son inicialmente inactivas, pero se convierten en activas tras la fosforilación en el residuo treonina 172 de AMPK α o por la sustitución de este residuo por un aspártico (T172D) o glutámico (T172E) (Sanz, 2008). Formas de AMPK α completas, con T172D o T172E y co-expresadas con las subunidades AMPK β y AMPK γ también actúan de manera constitutivamente activa (Solaz-Fuster et al., 2006).

Formas dominante negativas. Existen ciertos residuos críticos para la actividad catalítica de AMPK α , y cuya mutación genera formas catalíticamente inactivas, pero que siguen pudiendo unir a AMPK β y AMPK γ . Estas mutaciones son de lisina 45 a arginina (K45R), de aspártico 157 a alanina (D157A) y treonina 172 a alanina (T172A). La sobreexpresión de alguno de estos mutantes compite con AMPK α endógena por las subunidades AMPK β y AMPK γ endógenas, lo que llevaría a la inhibición de la actividad total de AMPK al generarse una gran mayoría de heterotrímero con subunidad AMPK α catalíticamente inactiva (Sanz, 2008).

4 Reconocimiento de proteínas diana por AMPK

El control que AMPK ejerce sobre las rutas que regula, se da por fosforilación de un residuo de serina o treonina dentro de una secuencia diana de la proteína en cuestión. En la **Figura 3** se muestra el alineamiento de las secuencias que flanquean los sitios de fosforilación por AMPK sobre varias proteínas (Towler and Hardie, 2007). De este alineamiento se ha deducido una secuencia consenso de fosforilación por AMPK (**Figura 3**): $\Phi XX\beta XXXS/TXXX\Phi$, donde Φ es un residuo hidrofóbico (M, I, L, F, V), β es un residuo básico (R, K, H) y X puede ser cualquier residuo, siendo S y T, serina y treonina respectivamente. Entre las dianas que AMPK fosforila de manera fisiológica afectando a su actividad, existen proteínas de metabolismo energético, proteínas de señalización celular, factores de transcripción y canales iónicos. Esto da idea del nivel de complejidad e importancia que el sistema AMPK posee para la regulación del balance energético celular y la integración de señales.

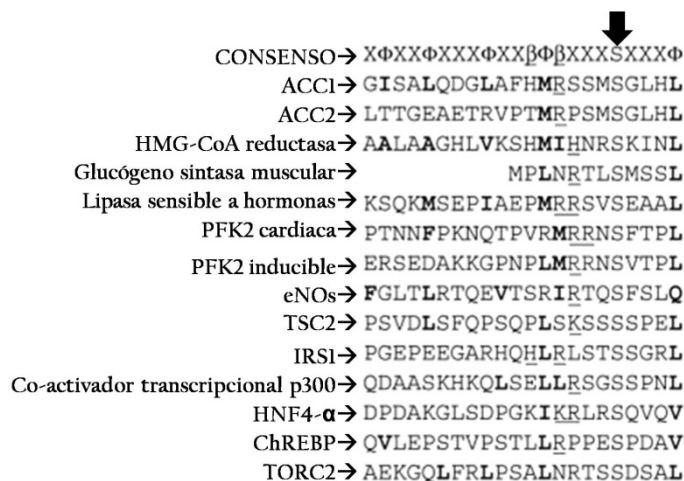


Figura 3. Alineamiento de la secuencia consenso de reconocimiento de AMPK sobre varias proteínas, las cuales fosforila de manera fisiológica. Las secuencias son de proteínas humanas y los residuos de serina fosforilados están indicados por una flecha, Φ es un residuo hidrofóbico (M, I, L, F, V), β es un residuo básico (R, K, H) y X puede ser cualquier residuo, siendo S y T, serina y treonina respectivamente. PFK2, 6-fosfofructoquinasa 2. HNF4-α, *hepatocyte nuclear factor 4*. TORC2, *transducer of regulated CREB-2*. TSC2, *tuberous sclerosis complex 2*. Modificado de (Towler and Hardie, 2007).

5 Efectos fisiológicos de AMPK

5.1 AMPK y metabolismo energético

Normalmente, en la mayoría de los tejidos de mamíferos, la presencia de insulina y factores de crecimiento (como el IGF-1, *insulin growth factor-1*), indican la existencia de nutrientes, y suelen promover la biosíntesis de lípidos, glucógeno y proteínas. Esto suele estar mediado por la cascada PI3K/Akt (**Figura 4**). En estas condiciones, Akt inhibe AMPK por fosforilación de los residuos Serina 485 de AMPKα1, y serina 491 de AMPKα2 (Sanz, 2008). PI3K/Akt ejerce una función antagónica de AMPK en muchas cascadas de control metabólico. No obstante, existen acciones en las que su acción es sinérgica, como la toma de glucosa (Towler and Hardie, 2007) (**Figura 4**).

INTRODUCCIÓN

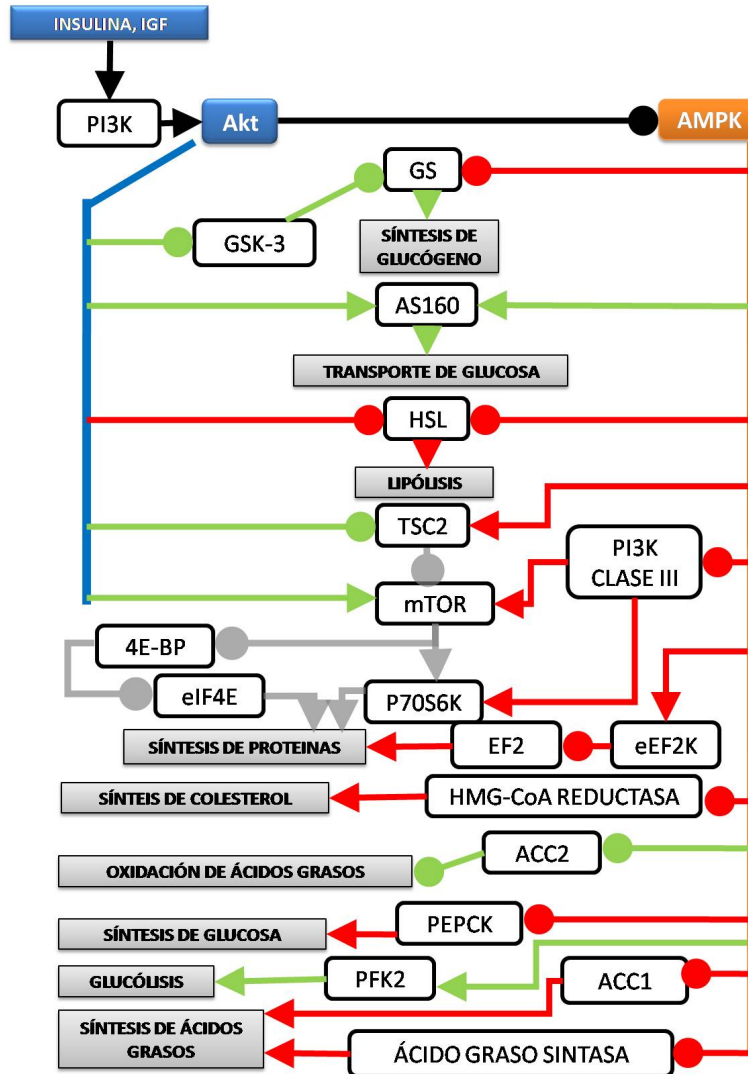


Figura 4. Esquema de las acciones de Akt y AMPK en el metabolismo energético. Las puntas de flecha indican activación y los círculos inhibición. El color rojo indica efecto final inhibitor sobre el proceso subyacente. El color verde indica efecto final activador sobre el proceso subyacente. GSK-3, glucógeno sintasa quinasa 3. eIF4E, *eukaryotic initiation factor 4E*. eEF2K, *eukaryotic elongation factor 2 kinase*. GS, glucógeno sintasa. AS160, *Akt substrate 160*. PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*. P70S6K, proteína ribosomal S6Kinasa. HSL, *hormone-sensitive lipase*. mTOR, *mammalian target of rapamycin*. TSC2, *tuberous sclerosis complex 2*.

INTRODUCCIÓN

Como ya se ha señalado, AMPK es un sensor metabólico que integra diferentes señales fisiológicas para dar una respuesta que pretende preservar el estatus energético celular. Para ello, **estimula el catabolismo** (que genera ATP) activando determinadas rutas como la toma de glucosa por parte de las células, la oxidación de ácidos grasos, la glucólisis (Towler and Hardie, 2007) y la degradación proteica (Witczak et al., 2008). En la misma línea, **reprime el anabolismo** (que consume ATP) inactivando rutas de síntesis de ácidos grasos, colesterol, glucógeno y proteínas (Towler and Hardie, 2007) (**Figura 4**). En la **Tabla 2**, a modo de resumen, están indicadas las rutas metabólicas, el efecto final y la diana inmediata sobre la que AMPK actúa. Además, queda indicado el tejido en el que se da cada efecto.

Como puede observarse, AMPK ocupa un papel central en el control del metabolismo energético, ya que regula directamente a las principales rutas metabólicas existentes en eucariotas. AMPK actúa sobre la actividad de enzimas catalíticos clave de las rutas metabólicas, y también es capaz de regular su expresión génica mediante la modulación de algunos factores de transcripción. Además, en eucariotas pluricelulares ejerce una acción coordinada en los diferentes tejidos, para mantener el estatus energético de todo el organismo (**Tabla 2**).

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Rutas metabólicas reguladas por AMPK. AS160, *Akt substrate 160*. CPT1, *carnitine palmitoyl-CoA transferase 1*. PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*. P70S6K, proteína ribosomal S6Kinasa 1. HSL, *hormone-sensitive lipase*. mTOR, *mammalian target of rapamycin*. TSC2, *tuberous sclerosis complex 2*. FOXO, *family of forkhead transcription factors*. MuRF1, E3 ubiquitina ligasa. Adaptación de tabla (Towler and Hardie, 2007) con datos de (Witczak et al., 2008)

Ruta metabólica	Tejido	Efecto de AMPK	Diana inmediata	Efecto inmediato
Toma de glucosa	Músculo	umenta	AS160	Sube translocación GLUT4
Toma de glucosa	Músculo	umenta		Sube expresión GLUT4
Toma de glucosa	Otras células	umenta		Sube actividad GLUT1
Toma de glucosa	Adipocitos	disminuye	GLUT4	Baja estimulación por insulina
Glucolisis	Músculo cardíaco	umenta	PFK2 cardíaca	Sube actividad de PFK2 cardíaca y fructosa-2,6-bisfosfatasa
Glucolisis	Monocitos. Macrófagos	umenta	PFK2 inducible	Sube actividad de PFK2 inducible y fructosa-2,6-bisfosfatasa
Oxidación de ácidos grasos	Músculo. Hígado. Otras células	umenta	ACC-2	Baja actividad de ACC-2 y malonil-CoA. Sube actividad de CPT1
Síntesis de ácidos grasos	Todas las células	disminuye	ACC-1	Baja actividad de ACC1
Síntesis de ácidos grasos	Hígado	disminuye	SREBP-1c, HNF4-1 α	Baja expresión de ACC1 y ácido graso sintasa
Síntesis de colesterol	Hígado	disminuye	HMG-CoA reductasa	Baja actividad de HMG-CoA reductasa
Síntesis de glucógeno	Músculo	disminuye	Glucógeno sintasa muscular	Baja actividad de glucógeno sintasa muscular
Síntesis de glucosa	Hígado	disminuye	TORC2	Baja expresión de PEPCK y glucosa-6-fosfatasa
Síntesis de proteínas	Todas las células	disminuye	EF2K	Baja elongación traducción proteica
Síntesis de proteínas	Todas las células	disminuye	TSC2	Baja actividad mTOR y P70S6K1
Degradación de proteínas	Músculo	umenta		Sube expresión de FOXO 1, FOXO 3, MuRF1
Autofagia	Todas las células	umenta	TSC2	Baja actividad mTOR
Lipólisis	Adipocitos	disminuye	HSL	Baja estimulación adrenérgica de Lipólisis
Lipólisis	Músculo	umenta	HSL	Sube degradación de triglicéridos

5.2 AMPK, metabolismo de proteínas, crecimiento y ciclo celular

Dado que el metabolismo energético es esencial y esta imbricado con el resto de procesos celulares, AMPK también está relacionada en la regulación de procesos como el crecimiento y el ciclo celular, que necesitan de gran cantidad de energía, lípidos y proteínas para poder ser llevados a cabo. AMPK afecta a estos otros procesos modulando la expresión génica y la actividad tanto de enzimas biosintéticos (Tabla 2, Figura 4), como de la maquinaria proteica degradativa (Witczak et al., 2008). AMPK está implicada también de manera compleja en la regulación de la apoptosis, aunque en algunas situaciones su activación estimula la apoptosis y en otras la inhibe o previene (Towler and Hardie, 2007). La senescencia celular es otro proceso que parece vinculado al incremento de la relación AMP/ATP y a la activación de AMPK. Esto fue observado en fibroblastos humanos y confirmado en experimentos con *C. elegans*. En estos gusanos, el ayuno, el choque térmico y determinadas mutaciones en genes implicados en señalización por insulina, producen un incremento de la relación AMP/ATP. La esperanza de vida de este nematodo aumenta cuando expresa una de las subunidades catalíticas de AMPK. Esto podría relacionar a AMPK con el aumento de la esperanza de vida que genera la restricción calórica en mamíferos (Towler and Hardie, 2007).

El crecimiento, y por ende, el ciclo celular, están estrechamente relacionados con el metabolismo de proteínas. La función de AMPK en el control del metabolismo de proteínas, crecimiento y ciclo celular podría estar vinculada, por un lado con la regulación de la síntesis de proteínas (vía TSC2/TOR) (Towler and Hardie, 2007; Witczak et al., 2008) y la degradación proteica (Witczak et al., 2008); y por otro, con la regulación del supresor tumoral p53 y los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas p21 y p27 (Towler and Hardie, 2007). Además, la modulación de la relación de la concentración citoplasma/núcleo de la proteína de unión a mRNA HuR parece ser otro mecanismo de control de ciclo celular en el que está implicada AMPK. Cuando AMPK está activada este ratio disminuye, perdiendo HuR su capacidad de estabilizar a determinados mRNA's de reguladores críticos de ciclo celular (Towler and Hardie, 2007).

INTRODUCCIÓN

5.2.1 *AMPK y síntesis de proteínas*

La síntesis de proteínas es un proceso que necesita de un aporte de nutrientes y energía muy elevado. Por ello, en situaciones de estrés o ayuno, cuando es necesario evitar su consumo y reponer energía, AMPK inhibe la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de varios sustratos, afectando tanto a la iniciación como a la elongación de la traducción. Por un lado, activa TSC2 por fosforilación en sus residuos de serina 1227 y 1345. El complejo TSC2/TSC1 tiene actividad GTPasa inhibitoria de mTOR, y con ello de la síntesis proteica a nivel de la iniciación de la traducción (Towler and Hardie, 2007; Witczak et al., 2008). Por otro lado, AMPK inhibe la PI3K de clase III que activa mTOR y a uno de sus sustratos P70S6K (Towler and Hardie, 2007). Además, AMPK activa por fosforilación a eEF2K, una quinasa que inhibe por fosforilación al factor de elongación de la transcripción EF2 (Jensen et al., 2009; Towler and Hardie, 2007) (**Figura 4**).

5.2.2 *AMPK y degradación de proteínas*

La degradación de proteínas es otro proceso que necesita gran cantidad de energía, y que produce gran cantidad de péptidos y aminoácidos susceptibles de ser usados de nuevo por el metabolismo, para generar energía o nuevas proteínas (Konstantinova et al., 2008; Reggiori and Klionsky, 2005). Por ello es probable que AMPK también esté implicada en el control de los dos mecanismos celulares mayoritarios encargados de la proteólisis: el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, *ubiquitin proteasome system*) y la autofagia.

El termino **autofagia** describe un proceso catabólico que degrada proteínas y orgánulos con la intervención de lisosomas (Levine and Kroemer, 2008). En la regulación de la autofagia tienen una importancia principal la señalización por aminoácidos dependiente de la ruta de mTOR. De esta forma, cuando la ruta mTOR esta activa, se promueve la síntesis de proteínas y se inhibe la autofagia (**Figura 5**). Dado que AMPK produce la inactivación de mTOR y la síntesis de proteínas, era probable que con esta acción activase la autofagia. Además, en levaduras, SNF1, el ortólogo de AMPK, es esencial para la ejecución de la autofagia (Codogno and Meijer, 2005). No obstante, y en contra de la hipótesis anterior, se observó que el tratamiento de hepatocitos con AICAR inhibía la autofagia. Sin embargo, resultados

INTRODUCCIÓN

posteriores comprobaron que el efecto de AICAR era independiente de la activación de AMPK y era debido a una activación directa de la PI3K de clase III/Beclin (Figura 5). Finalmente, el papel activador de AMPK sobre la autofagia ha quedado demostrado en células en las que se expresan mutantes constitutivamente activos de AMPK, observándose un aumento de la proteólisis por autofagia, mientras que si expresan mutantes constitutivamente negativos de AMPK la proteólisis por autofagia no se da (Meley et al., 2006).

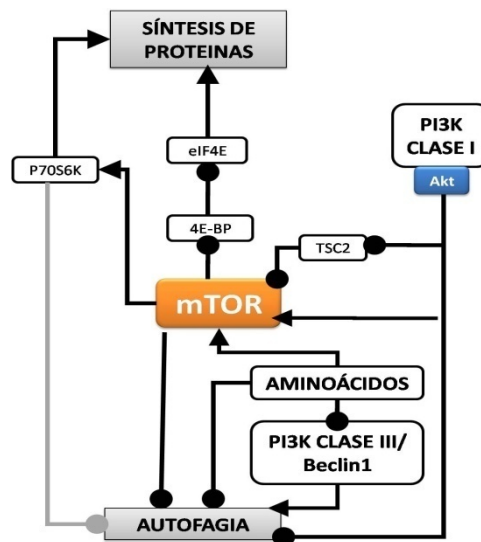


Figura 5. Ruta de señalización de mTOR en autofagia y síntesis de proteínas. En gris las relaciones hipotéticas no probadas. Las puntas de flecha indican activación y los círculos inhibición.

Se ha comprobado que AMPK puede tener cierta acción moduladora del sistema UPS (Sistema Ubicuitina-Proteasoma) en músculo. Se observó que el tratamiento con AICAR y metformina de células miotubulares C2C12 incrementa la expresión de ubiquitina ligasas de tipo E3 (como MAFbx, *atrogen-1/muscle atrophy F-box*; y MuRF1, *muscle specific RING finger protein*) (Krawiec et al., 2007; Nakashima and Yakabe, 2007). En ratones, la

INTRODUCCIÓN

inyección intravenosa de AICAR produce el mismo efecto en la expresión de MAFbx y MuRF1 (Nakashima and Yakabe, 2007). Parece ser, que el incremento en la expresión de estas ubiquitina ligasas tras el tratamiento con AICAR de células C2C12, se da mediante el incremento de la expresión de factores de transcripción FOXO 1 y FOXO3a (Nakashima and Yakabe, 2007). Por otra parte, la activación de la vía PI3K/Akt impide la expresión de factores FOXO y la expresión de MAFbx y MuRF1 (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). Estos resultados indican que AMPK y la vía PI3K/AKT podría tener cierta importancia la regulación del sistema UPS.

II) Sistema UPS

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS; *ubiquitin proteasome system*) presenta dos partes: el sistema de ubiquitinación y el proteasoma. El UPS es el encargado principal de la degradación selectiva de proteínas en células eucariotas. Este sistema reconoce, marca y degrada aquellas proteínas susceptibles de ser destruidas utilizando gran cantidad de energía y generando aminoácidos y polipéptidos. Proteínas mal plegadas, defectuosas, o que finalizan su vida útil, son reconocidas y marcadas por cadenas de ubiquitina mediante un sistema de ligasas de ubiquitina de tres componentes (Ubiquitinación); después, las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por el proteasoma.

No obstante, en los últimos años se ha probado que UPS no solo está vinculado a la degradación proteica, y tanto el proceso de ubiquitinación, como el proteasoma intervienen juntos o por separado en infinidad de procesos al margen de la degradación. Así por ejemplo, el marcaje de proteínas mediante mono- o poli-ubiquitina, con diferentes tipos de ramificación se ha visto implicado en control de localización subcelular, expresión génica, reparación del DNA, cascadas de señalización, endocitosis y tráfico intracelular. El proteasoma por su parte, además de su acción proteolítica, también está implicado en regulación de la expresión génica a varios niveles.

Es obvio pues que UPS es también un elemento clave en la regulación de un amplio abanico de eventos que sustentan la vida celular. Por ende, su funcionamiento anormal está asociado a múltiples patologías degenerativas neuronales y musculares, inflamatorias e inmunitarias, cáncer, fibrosis y diabetes de tipo 2.

1 Ubicuitinación

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona que sufren gran cantidad de proteínas. Consiste en la unión por un enlace covalente de una o varias moléculas de ubiquitina a una proteína sustrato. Este proceso es llevado a cabo específicamente por un sistema enzimático de tres componentes (E1, E2 y E3), y puede ser revertido por otro grupo de enzimas, las deubiquitininas (DUBs).

1.1 Ubiquitina

La molécula de ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos y 8,5 kDa. La ubiquitina es expresada por tres genes diferentes UBA, UBB y UBC situados en diferentes regiones del genoma eucariota. UBA y UBB se expresan como fusiones a proteínas ribosomales y UBC como un polímero lineal de ubiquitina. Todos ellos son procesados post-traduccionalmente para generar ubiquitina libre (Jentsch et al., 1991). La ubiquitina es una de las proteínas mas conservadas a lo largo de la evolución eucariota y su secuencia difiere en solo tres residuos entre levaduras y humanos (Pickart and Eddins, 2004). Su secuencia presenta siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y una glicina 76 (G76) (**Figura 6**), todos muy conservados y algunos de ellos importantes en la unión a sustrato y generación de cadenas poliubiquitinadas (Pickart and Fushman, 2004).

INTRODUCCIÓN

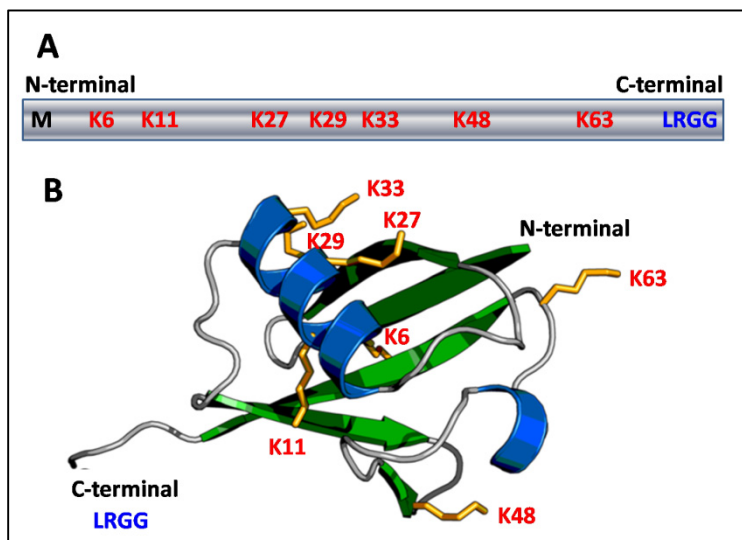


Figura 6. Ubiquitina. A, esquema lineal de la molécula de ubiquitina donde se indican las lisinas (K) y su posición en rojo y en azul el tetrapéptido C-terminal con la glicina 76. B, representación de la estructura terciaria de la ubiquitina y la ubicación de las 7 lisinas.

1.2 Ubiquitina ligasas

La reacción de ubiquitinación es un proceso de tres pasos altamente específico. Esta conjugación es catalizada por un sistema de tres proteínas denominadas: E1 (que activa la ubiquitina mediante gasto energético de ATP), E2 (que conjuga la ubiquitina temporalmente) y E3 (ubiquitina ligasa; que toma la ubiquitina de E2 y la liga al sustrato). La unión de la primera ubiquitina se produce entre el residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina (G76) y la cadena lateral de un residuo de lisina del sustrato o, a veces, por su N-terminal (Glickman and Ciechanover, 2002). La poliubiquitinación se da por unión de moléculas de ubiquitina de manera sucesiva a alguno de los residuos de lisina que posee la ubiquitina ya anclada al sustrato (Pickart and Fushman, 2004).

E1. Este enzima activa la molécula de ubiquitina generando con ella un enlace tiol-éster (E1-cisteína-GGRL-Ubiquitina) mediante el consumo de ATP (Figura 7). Normalmente cada organismo eucariótico presenta un solo

tipo de E1 para la ubiquitina, aunque existen excepciones en plantas (Pickart and Eddins, 2004).

E2. Las enzimas E2 actúan de puente entre E1 y E3. Su mecanismo de acción depende del tipo de E3 con el que interaccionen. Si el E3 es de tipo HECT, el E2 une la ubiquitina de E1 y luego la cede al E3. Si el E3 es de tipo RING, el E2 transfiere la ubiquitina directamente al sustrato (Figura 7). En mamíferos existen entre 30 y 40 E2 diferentes y cada uno de ellos interacciona con varios E3. Muchos de los E2 existentes intervienen en cierto grado en la especificidad en la ligación de ubiquitina al sustrato (Glickman and Ciechanover, 2002; Lecker et al., 2006).

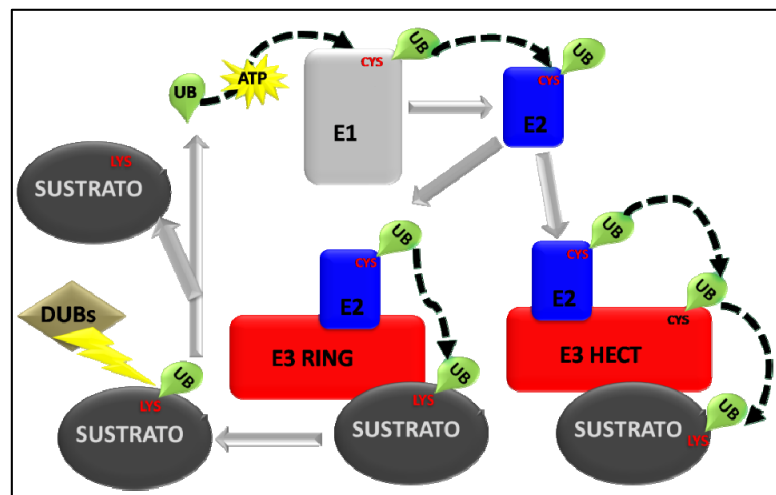


Figura 7. Esquema del mecanismo de ubiquitinación y deubiquitinación de un sustrato. CYS, indica cisteína del centro activo que une la ubiquitina (UB). LYS, indica la lisina del sustrato que recibe la ubiquitina. La flecha discontinua indica el camino de la ubiquitina, que es diferente según el E3 sea de tipo RING o HECT.

E3. Son enzimas o conjuntos de enzimas cuya función primaria es ligar la ubiquitina al sustrato con elevada especificidad. Existen dos tipos de E3. Los de tipo E3 HECT, son enzimas normalmente monoméricas (Lecker et al., 2006), que poseen un dominio conservado de 350 aminoácidos en su

INTRODUCCIÓN

parte C-terminal que integra una cisteína a la que se une la ubiquitina desde el enzima E2. El resto de la secuencia del enzima varía entre los diferentes E3 HECT, lo que es probable que confiera su especificidad (Glickman and Ciechanover, 2002). Las E3 RING son las E3 ligasas mayoritarias, y pueden ser mono o multiméricas (Lecker et al., 2006). Se caracterizan por presentar un motivo estructural denominado *RING finger*. Este dominio conservado, rico en cisteína e histidina, es capaz de unir cationes de zinc, y parece funcionar como anclaje de posicionamiento entre E2 y sustrato, para que la ubiquitina pueda ser transferida a este último (Glickman and Ciechanover, 2002). Recientemente se ha identificado un nuevo grupo de ubiquitina ligasas que presentan una versión modificada del motivo RING y que han sido denominadas E4 o ligasas U-box (Glickman and Ciechanover, 2002; Lecker et al., 2006). Su peculiaridad principal es que se han visto implicadas en la elongación de cadenas de poliubiquitina junto con E1, E2 y E3. Muchas de ellas actúan solo en colaboración con E1 y E2. No obstante, las E3 canónicas son necesarias para unir la primera ubiquitina al sustrato (Glickman and Ciechanover, 2002). Además, suelen estar reguladas o regularse a sí mismas mediante ubiquitinación, que induce estabilización o degradación (Deshaies and Joazeiro, 2009).

El modo de reconocimiento de sustrato por parte del sistema de ubiquitinación es variado y pasa por la modulación de sustrato y/o de alguno/os los componentes ubiquitina ligasa (E2, y E3). La actividad de los E3 puede ser regulada mediante fosforilación, moduladores alostéricos o interacción con proteínas mediadoras. En lo referente al sustrato, esta regulación puede darse mediante modificaciones covalentes como fosforilación, glicosilación, acetilación, hidroxilación y la unión de proteínas similares a la ubiquitina (UBL; *ubiquitin-like proteins*). Además, muchos sustratos presentan señales intrínsecas denominadas degrón, que median su poliubiquitinación para degradación. Los degrones tienen naturaleza variada. Algunos presentan una secuencia específica de aminoácidos cuya exposición genera el reconocimiento por ubiquitina ligasas o proteínas mediadoras. Otros son más complejos, como ocurre con los degrones N-terminal (*N-end rule pathway*). En estos, uno o unos pocos residuos de la región N-terminal del sustrato desestabilizan a la proteína, por sí mismos o porque inducen la acción de endopeptidasas, desaminasas, o arginina transferasas que generan la señal final de degradación (Glickman and

Ciechanover, 2002; Pickart and Eddins, 2004; Ravid and Hochstrasser, 2008). En muchas ocasiones estos modos de reconocimiento de sustrato se intercalan, lo que unido al elevado número de combinaciones E2-E3 posible genera una gran especificidad y variabilidad en la regulación de la ubiquitinación de proteínas.

1.2.1 Malina: una E3 ubiquitina ligasa

Malina es una E3 ubiquitina ligasa de tipo RING, tiene 385 aminoácidos y esta codificada en el gen *EPM2B* (*epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene B*). Además del motivo RING presenta seis dominios NHL implicados en la interacción entre proteínas. Mutaciones en malina generan la enfermedad de Lafora, una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva. La enfermedad de Lafora también se da por mutaciones en el producto del gen *EPM2A* que codifica para una fosfatasa dual denominada laforina, la cual posee un dominio de unión a carbohidratos. Malina y laforina interactúan y se ha observado que malina es capaz de poliubiquitinar a laforina induciendo su degradación por el proteasoma (Gentry et al., 2005). La formación del complejo malina-laforina es importante en la regulación negativa del metabolismo del glucógeno. La formación del complejo esta modulada positivamente por la fosforilación de laforina mediante AMPK (Solaz-Fuster et al., 2008). Existen más indicios que apuntan a que el par malina-laforina ejerce una regulación negativa sobre la síntesis de glucógeno, ya que están implicadas en la degradación de la glucógeno sintasa muscular y algunas proteínas que regulan positivamente la producción de glucógeno, como es R5, una subunidad reguladora de PPI (*protein phosphatase 1*), esta última también modulada por acción de AMPK (Vernia et al., 2009).

1.2.2 MDM2: una E3 ubiquitina ligasa

Mdm2 (*mouse double minute 2*) es una E3 ligasa de ubiquitina de tipo RING. Mdm2 se considera una oncoproteína, ya que regula negativamente la acción del supresor de tumores p53 (Shangary and Wang, 2009), que es un factor de transcripción de genes apoptóticos. MDM2 y p53 interactúan físicamente y además se regulan de manera recíproca. Así, p53 activa la transcripción de MDM2. Por su parte MDM2 inhibe la acción de p53 mediante 3 mecanismos. Uno de ellos, la unión MDM-p53, impide a p53 su

INTRODUCCIÓN

actuación como activador transcripcional. En otro, MDM2 monoubicuitina a p53 lo que induce su salida del núcleo celular. Y el principal de ellos es la poliubiquitinación de p53 por MDM2 que induce la degradación proteasomal de p53 (Brooks and Wei, 2004).

1.3 *Deubicuitinasas*

Las enzimas encargadas de revertir la reacción de conjugación de ubiquitina se denominan deubicuitinasas (DUBs). Las DUBs presentan actividad cisteína proteasa que hidroliza de manera específica enlaces isopeptídicos entre el grupo carboxilo de la glicina 76 de la ubiquitina y el residuo al que ésta se ancla (Glickman and Ciechanover, 2002). Las DUBs se dividen en cinco familias según su dominio proteasa. Cuatro de ellas son cisteína proteasas: hidrolasas de ubiquitina C-terminal (UCHs; *ubiquitin carboxy-terminal hidrolases*), proteasas específicas de ubiquitina (USPs; *ubiquitin specific proteases*), OTUs (*otubin proteases*) y MJDs (*Machado-Josep disease proteases*). Solo una de las familias, JAMM (JAB1/MPN/Mov34) presenta dominio metaloproteasa. En conjunto, las DUBs son muy abundantes y diversas, lo que hace suponer que tienen una alta especificidad de función y sustrato (Ventii and Wilkinson, 2008). Sus funciones primarias parecen ser el mantenimiento de niveles de ubiquitina libre, la regulación de la estabilidad de los conjugados de ubiquitina, su remodelado y colaborar en la degradación proteasomal (Glickman and Ciechanover, 2002).

1.4 *Funciones de la ubiquitinación*

La primera función conocida de la poliubiquitinación fue el marcaje para degradación de proteínas vía proteasoma. Aunque parece que esa es su función mayoritaria, se ha observado que tanto la mono como la poliubiquitinación pueden llevar a cabo otras funciones no degradativas, y trabajos posteriores la han confirmado como un elemento importante en la regulación de muchos eventos celulares. El tipo de función de las cadenas de ubiquitina se correlaciona bastante bien con la estructura específica de la misma, que viene determinada por el tipo de unión entre ubiquitinas. Esta unión puede ser: K6, K11, K27, K29, K33, K48 o K63, dependiendo del residuo de lisina que se una a la glicina 76 de la siguiente ubiquitina. Las cadenas poliubiquitinadas parecen presentar mayoritariamente un solo tipo de unión (Pickart and Fushman, 2004) (**Figura 8**). A continuación se

indican de manera resumida las funciones principales de los diferentes tipos de ubiquitinación.

- **Monoubicuitinación y multiubiquitinación.**

Se trata de la unión de una (monoubicuitinación) o varias ubiquitininas (multiubiquitinación) directamente sobre lisinas del sustrato. Está implicada en el control de varios eventos celulares, como endocitosis de receptores, canales iónicos, permeasas y transportadores, y en algunos casos está vinculada a degradación lisosomal. También se ha visto relacionada con el tráfico y localización intracelular, con reparación de DNA y con la regulación de la expresión génica, afectando a veces al estado de la cromatina (Haglund and Dikic, 2005).

- **Poliubiquitinación.**

Uniones K6 y K11. Se conoce la existencia de estas cadenas, pero todavía no tienen asignadas funciones específicas. K6 es reconocida e interacciona con el proteasoma 26S, sin embargo no dirige al sustrato a degradación como lo haría K48. Las uniones K11, muy abundantes en levadura, no han sido relacionadas con ningún tipo de regulación, aunque *in vitro* pueden funcionar como señales de degradación (Pickart and Fushman, 2004).

Uniones K29. Están vinculadas al direccionamiento del sustrato al proteasoma, aunque no está claro si implica proteólisis. Parece que en algunos casos la ramificación K29 actúa como señal para ubiquitinación en K48 reclutando factores E4 (Glickman and Ciechanover, 2002) (Pickart and Fushman, 2004).

Uniones K27 y K33. junto con K11 fueron encontradas en levadura mediante espectrometría de masas, son minoritarias y se desconoce su función (Peng et al., 2003). Sin embargo, se ha observado que en células de mamífero, K33 puede tener importancia en la regulación de dos proteínas quinasa de la familia de AMPK, como son NUK1 y MARK4, (Al-Hakim et al., 2008).

Uniones K48. Son consideradas mayoritarias y las cadenas poliubiquitinadas que las presentan dirigen el sustrato al proteasoma para su

INTRODUCCIÓN

degradación. Se ha demostrado que la longitud de poliubiquitinas K48 es importante en su afinidad por el proteasoma y por tanto para la degradación del sustrato (Pickart and Fushman, 2004).

Uniones K63. Las poliubiquitinas que presentan este tipo de puente intervienen en un amplio abanico de eventos celulares que excluye la degradación proteasomal. Están implicadas en reparación de DNA, tráfico y localización intracelular, respuesta inflamatoria, función ribosomal, y regulación de cascadas de señalización. (Glickman and Ciechanover, 2002; Pickart and Fushman, 2004).

Así pues, conocer si una proteína se ubiquitina y el tipo de ubiquitinación que contiene, puede dar indicios sobre el tipo de regulación que sufre bajo esta modificación post-traducciona. Además, debe tenerse en cuenta que la ubiquitinación, la fosforilación, y otras modificaciones post-traduccionales como la sumoilación, pueden ejercer una acción combinada en la regulación de la actividad de un mismo sustrato (Hunter, 2007).

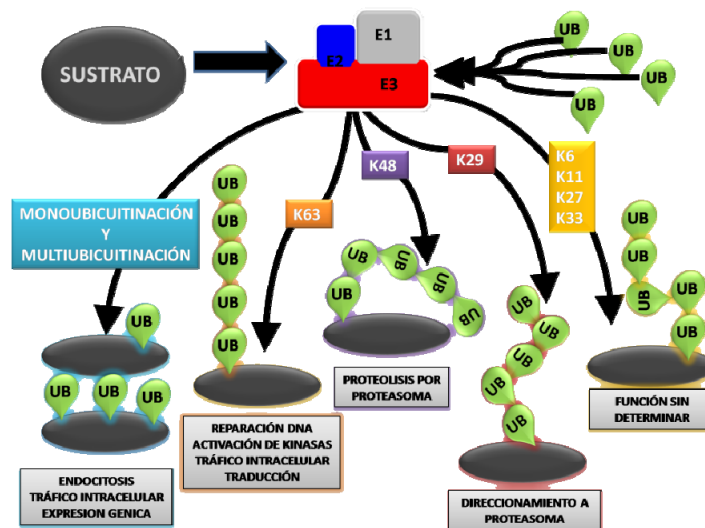


Figura 8. Esquema de los diferentes tipos de cadenas mono y poliubiquitinadas y eventos celulares en los que se ha demostrado que intervienen.

2 El proteasoma

El proteasoma es un complejo multimérico extraordinariamente complejo cuya función primaria es la degradación de proteínas marcadas con cadenas de ubiquitina con unión K48, como ya se ha señalado. Esta degradación proteica es llevada a cabo de manera específica y eficiente mediante el consumo de ATP. La degradación específica mediada por el sistema UPS afecta a la mayoría de proteínas celulares, entre ellas, gran cantidad de proteínas reguladoras. Por ello, está implicado en la modulación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación, respuesta inmune y metabolismo. Además, el proteasoma 26S o algunos de los módulos que lo componen (núcleo catalítico 20S y partícula reguladora 19S), al margen de sus actividades proteolíticas conjuntas, se ven implicados en la regulación de la expresión génica a varios niveles (Konstantinova et al., 2008; Murata et al., 2009; Tanaka, 2009).

2.1 Estructura y funcionamiento del proteasoma

El proteasoma está formado por dos subcomplejos multiprotéicos con diferente funcionalidad, denominados 19S y 20S, según su coeficiente de sedimentación en centrifugación en gradiente de densidad. El núcleo catalítico con actividad proteasa es 20S, su masa molecular aproximada es de 750 kDa y presenta forma cilíndrica. El subcomplejo regulador es el 19S, con una masa aproximada de 700 kDa. El 20S se une por sus extremos a uno o dos subcomplejos 19S, formando el proteasoma 26S, que desarrolla la actividad proteasa dentro del sistema UPS (Konstantinova et al., 2008; Murata et al., 2009; Tanaka, 2009) (Figura 9).

INTRODUCCIÓN

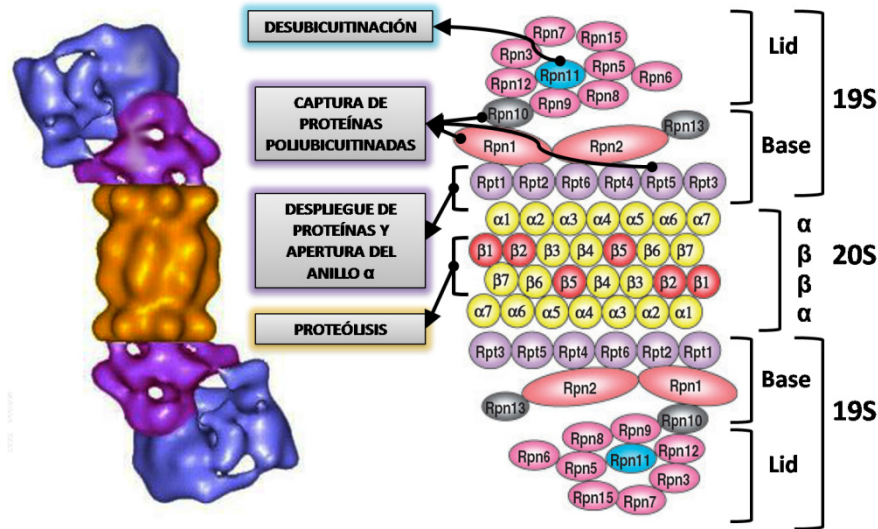


Figura 9. Estructura del proteasoma y función de alguna de sus subunidades. A la izquierda reconstrucción de estructura tridimensional del proteasoma a partir de micrografías de microscopía electrónica. A la derecha esquema abierto de la organización del proteasoma, donde las diferentes subunidades presentan la denominación que reciben en levaduras. Modificado de (Murata et al., 2009)

2.1.1 Estructura y funcionamiento del núcleo catalítico 20S

La estructura cilíndrica del núcleo catalítico 20S está formada por cuatro anillos, dos externos formados por siete subunidades α distintas, y dos internos con siete subunidades β , también distintas, quedando una estructura $\alpha_{1-7} \beta_{1-7} \beta_{1-7} \alpha_{1-7}$ (Figura 9). En procariotas, el núcleo catalítico del proteasoma se ordena de la misma manera pero los anillos son homoheptameros y generan una estructura $\alpha\beta\beta\alpha$. La partícula 20S presenta capacidad proteolítica similar en todos los eucariotas, y la estructura y función de las subunidades que integran el cilindro también está conservada a lo largo de la mayoría de eucariotas (Konstantinova et al., 2008; Tanaka, 2009).

La actividad hidrolítica reside en un residuo de treonina de la parte N-terminal en las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$ de los dos anillos internos

(Figura. 9). $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$ presentan actividad caspasa proteasa que capacita para corte en C-terminal de aminoácidos ácidos, tripsina proteasa que corta en C-terminal de aminoácidos básicos y quimiotripsina proteasa que corta en C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente. El acceso a estos sitios catalíticos de los anillos β esta ocluido por las colas N-terminal de las subunidades α de los anillos externos, cuya apertura *in vivo* probablemente depende de la acción de las partículas reguladoras 19S. No obstante, se ha observado que, *in vitro* el núcleo catalítico 20S tiene actividad proteolítica por sí solo, y es capaz de generar oligopeptidos de entre 3 y 15 aminoácidos (Konstantinova et al., 2008; Tanaka, 2009). En mamíferos existen tres subunidades catalíticas adicionales a las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$, denominadas βli , $\beta 2i$, y $\beta 5i$. Estas subunidades adicionales reemplazan a las primeras en los proteasomas formados en presencia de interferón-gamma (IFN γ), dando lugar a los denominados **inmunoproteasomas**. El inmunoproteasoma presenta mayor actividad hidrolítica tripsina y quimiotripsina y menor actividad caspasa. Esto genera péptidos con mayor capacidad para unirse al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC; *major histocompatibility complex*), mejorando la presentación antigénica y la respuesta inmune (Konstantinova et al., 2008; Tanaka, 2009).

2.1.2 Estructura y funcionamiento de la partícula reguladora 19S

La partícula reguladora 19S reconoce las proteínas diana marcadas con poliubiquitina, libera la marca de ubiquitina, cataliza el despliegue de la proteína diana, abre el anillo de subunidades α y transfiere la proteína desplegada dentro del núcleo 20S. Para ello, el 19S se vale de un conjunto de al menos 19 subunidades, algunas con capacidad ATPasa (Rpt; *regulatory particle of triple-ATPase*) y otras no ATPasa (Rpn; *regulatory particle non-ATPase*) que se reparten en dos subcomplejos: la Tapa (*Lid*) y la Base.

El *Lid* tiene los sitios de unión de los sustratos poliubiquitinados y presenta las actividades deubiquitinasa que liberan la marca de la proteína diana permitiendo su degradación (Konstantinova et al., 2008; Tanaka, 2009). El *Lid* se agrupa a su vez en dos subcomplejos, uno cercano a la Base compuesto por cuatro subunidades PSMD3 (Rpn3), PSMD6 (Rpn7), PSMD8 (Rpn12) y SHFM1 (Rpn15) (entre paréntesis el nombre de los ortólogos en levadura), y otro arriba formado por cinco subunidades PSMD7

INTRODUCCIÓN

(Rpn8), PSMD11 (Rpn6), PSMD12 (Rpn5), PSMD13 (Rpn9) y PSMD14 (Rpn11) (Murata et al., 2009; Sharon et al., 2006) (Figura. 10).

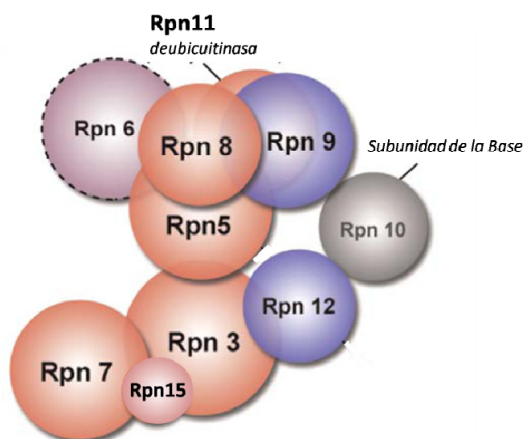


Figura 10. Organización de las subunidades del Lid obtenida por espectrometría de masas. Modificado de (Sharon et al., 2006)

Respecto a la función del 19S tiene particular interés la subunidad PSMD14 (Rpn11), ya que es la única actividad catalítica del Lid, y presenta actividad deubiquitinasa que libera la cadena de poliubiquitina completa de la proteína sustrato (Tanaka, 2009). Extremadamente conservada en el proteasoma de eucariotas, PSMD14 (Rpn11), parece el punto clave que acopla la deubiquitinación con la degradación proteolítica, y además parece necesitar de su extensa red de interacciones con el resto de proteínas que la rodean en el Lid para poder adquirir un plegamiento catalíticamente activo (Sharon et al., 2006). Otra subunidad de interés a este respecto es PSMD11 (Rpn6), una subunidad no ATPasa de 422 aminoácidos que se caracteriza por interactuar con NF- κ B2/p100 tras la fosforilación y ubiquitinación de este (Fong et al., 2002). PSMD11 presenta un dominio PCI (*Proteasome, COP9, cIF3*) en su región C-terminal, que está implicado en interacciones proteína-proteína, y que parece ser esencial para el correcto ensamblaje del Lid (Glickman and Ciechanover, 2002). Se ha observado también que, al menos

en levaduras, Rpn6 es esencial para el ensamblaje del Lid, ya que su ausencia evita la incorporación de Rpn3, Rpn7, Rpn12, y Rpn15. No obstante, una vez ensamblado su efecto sobre la actividad catalítica del proteasoma es pequeño (Isono et al., 2005). Además, parece ser que la abundancia de Rpn6 es subestequiométrica respecto a la cantidad de 19S (Sharon et al., 2006). Dada su subestequiometría e importancia para el ensamblaje del Lid de la partícula 19S del proteasoma, se ha propuesto que de PSMD11 (Rpn6) podría tener un papel regulador de la actividad del proteasoma 26S en el sentido de poder modular el reconocimiento y la desubiquitinación ocultando o exponiendo determinados sitios activos o de reconocimiento presentes en el Lid (Sharon et al., 2006).

La Base está compuesta por seis ATPasas (Rpt1-Rpt6) que interaccionan con los anillos α externos de núcleo catalítico 20S, son necesarias para desplegar las proteínas sustrato e introducir las dentro del canal catalítico del 20S abriendo el anillo α . También está compuesta por cuatro no ATPasas (Rpn 1, 2, 10 y 13), que median en el reconocimiento y el anclaje de sustratos poliubiquitinados (Konstantinova et al., 2008; Tanaka, 2009). Además, algunas de sus subunidades, interaccionan con dos DUBs: Usp14 (UBP6), que corta residuos de ubiquitina de la parte distal de la poliubiquitina y que interacciona con Rpn1, y Uch 37, que interacciona con Rpn13 y está relacionada con la modificación de poliubiquitinas (Tanaka, 2009).

2.1.3 Otras partículas reguladoras

Además de de la partícula reguladora 19S existen otros complejos reguladores que se unen al núcleo catalítico 20S por sus anillos externos y regulan la actividad del proteasoma. Algunos ejemplos son el regulador PA28 o la proteína PA200. Existen tres tipos de regulador PA28 que tienen estructura cónica compuesta por subunidades α , β y γ . PA28 $\alpha\beta$ es un hetero-oligómero cuya expresión está inducida por interferón γ (INF- γ) y parece implicado en el procesamiento de antígenos MHC de clase I. PA28 γ es un homo-oligómero cuya expresión está regulada negativamente por INF- γ presenta localización predominantemente nuclear, y parece implicado en regulación del ciclo celular y apoptosis, ya que contribuye a la degradación de reguladores como p53 y p21. PA200 es una proteína de cadena simple que se expresa mayoritariamente en el núcleo, activa la proteólisis de péptidos

INTRODUCCIÓN

pero no de proteínas, y parece tener cierta importancia en la estabilidad de la cromatina y en la reparación del DNA. Estas dos partículas alternativas pueden unirse al núcleo catalítico 20S por un extremo, estando el opuesto unido a 19S, y formar proteasomas híbridos, que modulan la actividad hidrolítica o las pautas de corte de los polipéptidos (Konstantinova et al., 2008; Tanaka, 2009).

2.2 *Modulación de la actividad proteasomal*

Dada la importancia de la actividad proteasomal, ésta se ve regulada a varios niveles. Por un lado, la abundancia de proteasomas está regulada al modularse la expresión de sus subunidades. Por otro, está regulada su ubicación intracelular, ya que algunas subunidades presentan señal de localización nuclear (NLS; *nuclear localization signal*). Además, como se ha indicado anteriormente, se da una regulación dependiente de la composición del núcleo catalítico 20S o de la naturaleza de la partícula reguladora 19S. Igualmente, en muchas subunidades proteasomales se dan modificaciones post-traduccionales (como la fosforilación, la N-acetilación, la meristoilación, la glicosilación y el procesado N-terminal) susceptibles de ejercer algún tipo de regulación sobre la actividad del proteasoma.

De todas las **modificaciones post-traduccionales**, la más común en subunidades del núcleo 20S es la fosforilación. La fosforilación parece estar implicada en el control de su actividad proteolítica (e.g. subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$), la unión a diferentes partículas reguladoras (e.g. subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$), o la localización subcelular del proteasoma (e.g. subunidad $\alpha 7$) (Konstantinova et al., 2008). Algunas de las subunidades de partículas reguladoras (19S, 11S y PA28) también sufren estas modificaciones. Dos ejemplos son las subunidades PSMD11 y PSMD14 de la partícula reguladora 19S, de las que se ha señalado su posible importancia en la regulación del proteasoma. PSMD11 pierde la metionina inicial, sufre acetilación del segundo aminoácido y está fosforilada en las serinas 14 y 79, y PSMD14 está fosforilada en la serina 224 (Wang et al., 2007). Asimismo, El estado de fosforilación o desfosforilación de subunidades de 11S y PA28 se ha relacionado con cambios en la actividad de los proteasomas que presentan estas partículas reguladoras no canónicas. Aunque la función de la mayoría de las modificaciones de las subunidades del proteasoma todavía no está clara, su presencia no es constante, y cambian según el estado fisiológico de

la célula (Konstantinova et al., 2008). Todo ello parece indicar que las modificaciones post-traduccionales del proteasoma están muy implicadas en el control de la actividad proteasomal, sobre todo la fosforilación, mediando el ensamblaje, interacción, y actividad de sus subunidades, así como en la localización subcelular del proteasoma.

En el caso de células de mamífero se ha observado que la **expresión de genes que codifican proteínas del proteasoma** es dependiente del estado proliferativo celular. En algunas líneas cancerosas con elevados estados proliferativos, la expresión de proteasomas es extremadamente alta. Lo mismo ocurre en algunas líneas normales cuando se someten a tratamientos con mitógenos. Adicionalmente, el tratamiento de líneas celulares normales (cultivos primarios de músculo de rata) o cancerosas (HEK293, COS y HeLa) con inhibidores del proteasoma como MG132 y lactacistina aumenta la expresión génica y la traducción de subunidades del núcleo catalítico 20S y de la partícula reguladora 19S. Esto parece indicar la existencia de un mecanismo de compensación por el cual la propia actividad proteasomal regula su propia expresión (Konstantinova et al., 2008).

La **localización y distribución subcelular** de los proteasomas en células eucariotas parece depender del estatus metabólico y del tipo celular. Por ejemplo, algunas células embrionarias y cancerosas presentan acumulación nuclear de proteasomas, y en otras como células hepáticas de rata se encuentran mayoritariamente en el citoplasma. En este compartimento se han encontrado proteasomas en la matriz citosólica y unidos al retículo endoplásmico. En el núcleo aparecen en la matriz nuclear, interactuando con la cromatina, formando parte de cuerpos nucleares (NB; *nuclear bodies*) y de otras estructuras focalizadas. Los mecanismos que median en la distribución dinámica de los proteasomas se desconocen, aunque existen NLS en algunas subunidades proteasomales, y se ha visto que en algunos casos el estado de fosforilación de ciertas subunidades del proteasoma media en su localización núcleo-citoplásmica (Konstantinova et al., 2008).

INTRODUCCIÓN

2.2.1 *Regulación de la actividad proteasomal por PKA*

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) es un importante regulador metabólico. Está activada por AMP cíclico generado, entre otras, por acción hormonal. Entre las funciones de PKA destaca la estimulación de la síntesis de glucosa (gluconeogénesis) en hígado y la contribución al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa sanguínea.

La regulación que la PKA ejerce sobre el proteasoma es un ejemplo concreto de modulación de la actividad del proteasoma por fosforilación. En línea con la observación de que el ayuno en células musculares aumentaba la actividad proteolítica del proteasoma (Jagoe and Goldberg, 2001), se comprobó que la PKA era capaz de estimular la actividad proteolítica del proteasoma mediante fosforilación de la serina 120 de Rpt6, subunidad ATPasa de la Base del complejo 19S del proteasoma. Este control metabólico que PKA ejerce sobre el proteasoma se ve apoyado por el hecho de que la modificación post-traducciona de la subunidad Rpt2, otra ATPasa de la Base, mediante acilación con O-GlcNAc por la enzima OGT (*O-GlcNAc transferase*) cursa con la inhibición de la actividad proteasomal. PKA regula la generación de O-GlcNAc, y en presencia de OGlcNAc-Rpt2, PKA es incapaz de estimular la actividad del proteasoma. De este modo la acción de estas dos proteínas sobre la actividad del proteasoma se ve autoregulada, actuando para facilitar la generación de aminoácidos glucogénicos en condiciones de ayuno (Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b).

2.3 *Funciones celulares del proteasoma*

A nivel celular el proteasoma o sus módulos (núcleo catalítico 20S y partícula reguladora 19S) intervienen como parte clave en varios eventos celulares como son: la regulación de la estabilidad de las proteínas moduladoras de la proliferación celular mediante el sistema UPS, la generación de péptidos antigénicos usados por el sistema inmunitario y formando parte de componentes que intervienen en la reparación del DNA y modulando la expresión y transcripción génica.

2.3.1 *Proliferación y apoptosis*

Mediante su actividad proteolítica dentro del sistema UPS, llevan a cabo la degradación de proteínas reguladoras del ciclo celular (como

ciclinas, y reguladores negativos de ciclo como p21 y p27). También afecta de manera compleja a la apoptosis. Degrada proteínas pro- y anti-apoptóticas (como factores de transcripción c-Fos, c-Myc, NF- κ B, AP-1, y supresores de tumores p53, I κ Ba, Bcl-2, etc.) (Konstantinova et al., 2008). Así pues, parece que el proteasoma actúa como pieza clave manteniendo un balance crítico entre proteínas pro- y anti-apoptóticas. Mediante el uso de inhibidores proteasomales se ha observado que la inhibición proteasomal antes de la inducción de la apoptosis, genera acumulación de proteínas anti-apoptóticas y por tanto supervivencia. Por el contrario, la inhibición proteasomal después de la inducción apoptótica cursa con la acumulación de proteínas pro-apoptóticas y por ende la muerte celular (Sohn et al., 2006a) (Sohn et al., 2006b). También se ha visto que la inhibición proteasomal mediante inhibidores químicos tiene efectos diferentes, o incluso contradictorios, dependiendo del tipo celular, del grado de inhibición proteasomal (la dosis de inhibidor usado) y del tiempo de tratamiento (Meiners et al., 2008):

2.3.2 Regulación de la expresión génica a varios niveles.

Esta regulación mediada por el proteasoma se da mediante dos vías: una vía proteolítica y una vía no proteolítica. La proteólisis de factores de transcripción, coactivadores, remodeladores de cromatina, factores de elongación, etc., interviene en la modulación de la expresión génica. Por otro lado, en la vía no proteolítica, ciertas subunidades o módulos del proteasoma actúan formando parte de otros complejos que regulan la expresión génica. Así por ejemplo, las partículas 19S y 20S se han visto asociadas con muchos promotores, y correlacionan con una mayor presencia de la RNAPol II en los mismos. La presencia de la partícula 19S es necesaria para la procesividad de la RNAPol II. El 19S también presenta actividad helicasa de DNA y forma parte de SAGA (macrocomplejo histona-acetil-transferasa regulador de la expresión génica). 19S interviene igualmente en algunos complejos de reparación de DNA. A nivel de traducción génica, la acción proteasomal afecta la transcripción de genes de proteínas ribosomales y a la estabilidad de determinados factores de iniciación y elongación, así como la estabilidad de ciertos RNA mensajeros (mRNAs), ya sea degradando sus factores estabilizadores o degradando mRNAs directamente mediante una probable actividad RNAsa presente en el proteasoma 26S (Konstantinova et al., 2008).

Objetivos

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de la presente tesis doctoral es buscar la posible relación funcional entre AMPK y el sistema ubiquitina proteasoma (UPS). Este objetivo está basado en el hallazgo previo de nuestro laboratorio de que la subunidad AMPK β interaccionaba por doble híbrido con la subunidad PSMD11 no ATPasa del Lid de la partícula 19S del proteasoma.

Objetivos parciales

1) En la primera etapa definiremos la acción de AMPK sobre PSMD11 y comprobaremos si AMPK modula la actividad del proteasoma. Analizaremos también el efecto de A-769662, un activador de AMPK, sobre la actividad del proteasoma.

2) En la segunda etapa definiremos la acción de UPS sobre AMPK. Dado que AMPK presenta relaciones funcionales ya definidas por nuestro laboratorio con el par Malina-Laforina, nos centraremos en el estudio de la acción de la E3 ubiquitina ligasa Malina junto con la fosfatasa dual Laforina sobre las subunidades y la actividad de AMPK.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Reactivos comunes de Biología Molecular

Los reactivos generales de Biología Molecular utilizados en el laboratorio han sido proporcionados por Biomol, Clontech, J.T. Baker, Fluka, Lonza, Merck, Panreac, Promega, Roche y Sigma. En el resto de casos se menciona la casa comercial que proporcionó el correspondiente producto entre paréntesis. Los fármacos y agentes químicos usados como moduladores de actividades enzimáticas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Fármacos y agentes químicos

AGENTE	DISOLVENTE	PROCEDENCIA
A769662	DMSO	Dr. Kei Sakamoto (College of Life Sciences, University of Dundee)
AICAR	H ₂ O	Toronto Research Chemicals Inc.
Berberina	DMSO	SIGMA
EGCG	DMSO	SIGMA
Epoxomicina	H ₂ O	BIOMOL (Exeter, UK)
Fenformina	H ₂ O	SIGMA
Genisteína	DMSO	SIGMA
Lactacistina	H ₂ O	BIOMOL (Exeter, UK)
Metformina	H ₂ O	SIGMA
MG-132	DMSO	BIOMOL (Exeter, UK)
Resveratrol	DMSO	SIGMA

2 Material biológico y condiciones de crecimiento

2.1 Cepas bacterianas

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α fué usada como huésped para la producción de plásmidos y construcciones. Fue crecida en medio Luria-Bertani, [LB, peptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,5] y para la selección de plásmidos se utilizó 100 μ g/mL de ampicilina. La temperatura de crecimiento fue de 37^o C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Escherichia coli* BL21-RIL fué usada como huésped para la producción de proteínas. Fue crecida en medio LB y para la selección de plásmidos fue suplementado con 50 mg/L de ampicilina y 33mg/L de cloranfenicol. La temperatura de crecimiento fue de 37º C.

2.2 Cepas de levadura

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas fueron:

- TAT7: MATa *ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80* LYS2::LexAop-HIS3, URA3::LexAop-lacZ, cedida por R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).
- CTY10.5d: MATa *ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80* URA3::LexAop-lacZ, cedida por R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).

Los cultivos de levadura se crecieron en medio rico YPD [extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)] o en medio sintético completo SC [YNB (Difco™ Yeast Nitrogen Base) 0,67%, mezcla de aminoácidos al 0,095%] con los suplementos adecuados para mantener la selección de los plásmidos y con diferentes fuentes de carbono (glucosa o rafinosa) usando las concentraciones indicadas en cada caso. La temperatura de crecimiento fue de 30º C. Los cultivos se crecieron en medio líquido con agitación continua en un agitador orbital a 200 r.p.m. Los medios sólidos se prepararon con agar al 2% (p/v).

La transformación de levadura se llevó a cabo usando el protocolo del acetato de litio (Ito et al., 1983). La cepa de levadura correspondiente se creció en YPD o en SC con los requerimientos adecuados hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) entre 0,3 y 0,8. Tras centrifugar, las células se resuspendieron en 500 µL tampón TE-LiAc (acetato de litio 0,1 M pH 7,5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A 50 µL de las células en tampón TE-LiAc, se le adicionó 2 µL de DNA de esperma de salmón (Sigma) como DNA vehículo, 3 µL de cada plásmido y 300 µL de PEG-TE-LiAc [tampón TE-LiAc al que se le añade PEG al 40% (p/v)]. Tras una incubación a 30º C durante 30 min, se efectuó un choque térmico a 42º C durante 5 min

MATERIALES Y MÉTODOS

en presencia de DMSO al 10% (v/v). Después, se lavaron las células con agua estéril y se sembraron en las placas de SC correspondientes al requerimiento de aminoácidos para la selección de los plásmidos. Las células se dejaron crecer a 30° C durante tres días.

2.3 Cultivos celulares

El material plástico de cultivos en el que se han sembrado las células ha sido proporcionado por Sarstedt. El trabajo que ha implicado manipulación de los cultivos celulares ha sido realizado en una campana de bioseguridad de nivel II-A.

El crecimiento de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en condiciones constantes de temperatura (37° C) y concentración de CO₂ (5%) y en atmósfera húmeda. Los pases necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares se han realizado mediante tripsinización [Tripsina-EDTA, 200 mg/L EDTA, 500 mg/L Tripsina 1:250, (BioWhittaker)].

Para conservar durante largo tiempo las células, éstas se resuspendieron en el correspondiente medio de cultivo al que se le adicionó un 10% (v/v) de DMSO y se pasaron a un criotubo donde se congelaron lentamente a -80° C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37° C, y después se diluyeron las células en el correspondiente medio y fueron centrifugadas y sembradas con su medio de cultivo.

Se han utilizado las siguientes líneas continuas y cultivos primarios de células de mamífero:

- **HEK293T**: Células embrionarias de riñón humano. Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC). También se ha utilizado una variante de HEK293 denominada **HEK293-GFPu-1** procedente de la colección americana de cultivos tipo (ATCC), que expresa de manera estable una fusión entre la proteína verde

MATERIALES Y MÉTODOS

fluorescente (GFP; *green fluorescent protein*) y una señal específica de degradación porteosomal (degron CLI) (Bence et al., 2001).

- **HeLa:** Línea de células epiteliales humanas inmortalizadas procedentes de un carcinoma cervical. Fueron cedidas por el Dr. Vicente Andrés (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Todas ellas se crecieron en placas de 60 o 100mm en medio DMEM completo (Lonza bioscience, Barcelona) con 10% (v/v) de FBS inactivado y suplementado con glutamina 2 mM, 100 μ /ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin.

Los métodos de transfección usados sobre estas líneas fueron:

Fosfato cálcico (Graham and Van der Eb, 1973). Entre 3 y 5 horas antes de la transfección se reemplazó la mitad del medio de cada placa por medio fresco. Para placas de 100 mm de diámetro, se mezcló 600 μ L de HBS 2 x [NaCl 280 mM, Hepes (*N*-[2-Hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) 50 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,05], 1 a 5 μ g de cada plásmido y 60 μ L de CaCl₂ 2 M. Tras esperar 20 min para que se formaran los precipitados de fosfato cálcico, se añadió lentamente a las placas donde se habían sembrado las células el día anterior. Para placas de 60mm la mezcla se efectuó con un tercio de la cantidad de cada componente. En los casos en los que el ensayo necesitaba más de 24 horas post-transfección, el medio que contenía la mezcla de transfección era retirado a las 20 horas y renovado por DMEM fresco.

Lipofectamina 2000 (Invitrogen), un reactivo basado en lípidos catiónicos capaces de atravesar la membrana plasmática, que fue usado según las instrucciones del proveedor.

- **Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs; *mouse embryonic fibroblast*):** de tipo silvestre y dobles mutantes que carecen de las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 (α 1^{-/-} y α 2^{-/-}) cedidos por Dr. Benoît Viollet (Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), 75014 París, Francia y el INSERM U567, 75014 París, Francia)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se crecieron en placas de 60 mm, 100 mm o placas de microtítulo de 96 pocillos en medio DMEM completo (Lonza bioscience, Barcelona) con 10% (v/v) de FBS inactivado y suplementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 u/ml y estreptomycinina 100 µg/ml.

3 Plásmidos

3.1 *Vectores de expresión en levadura*

Las proteínas de fusión con LexA se generaron usando el vector pEG202 (Golemis et al., 1997), que lleva el marcador *HIS3* o el vector pBTM116 (Vojtek, 1997) que lleva *TRP1* de marcador.

Las fusiones con GAD (*GAL4 Activation Domain*) se obtuvieron a partir del vector pACT2 (Legrain et al., 1994) que, además, lleva una etiqueta HA (Hemaglutinina) y cuyo marcador es *LEU2*.

3.2 *Vectores de expresión en bacterias*

Los plásmidos pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) se utilizaron para expresar proteínas de fusión con GST en *Escherichia coli* BL21-RIL.

3.3 *Vectores de expresión en células de mamífero*

El vector pEGFP-N1 (Promega), que fue amablemente cedido por el Dr. Jordi Pérez-Tur (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC) fue utilizado para expresar fusiones a GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo C-ter de la proteína clonada.

Para expresar proteínas etiquetadas con *myc* o con HA en células de mamífero, utilizamos el vector pCMV-*myc* o pCMV-HA (BD-Biosciences), que presenta el promotor viral de citomegalovirus (CMV) para alta expresión proteica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema pCDNA4/HisMax ABC (Invitrogen) que permite clonar en cualquiera de las tres pautas de lectura, se usó para sobreexpresión de proteínas con epítipo de 6 histidinas bajo un promotor CMV y un potenciador QBI SP163.

3.4 Construcciones solicitadas

Las construcciones solicitadas para la realización de ensayos en levadura fueron: pBTM116-AMPK α 2, pBTM116-AMPK α 2(T172D), pBTM116-AMPK β 2, pACT2-AMPK β 2, pACT11-AMPK β 1, pBTM116-AMPK γ 1, pWS93-AMPK γ 1 (Solaz-Fuster et al., 2006); pBTM116-AMPK γ 3A (34-489) (Viana et al., 2007)

Las construcciones solicitadas para la realización de ensayos en células de mamífero fueron: pCMV-HA-AMPK α 2, pCMV-Myc-AMPK α 2, pCMV-myc-AMPK α 2 (T172D), pCMV-HA-AMPK β 2 y pCMV-Myc-AMPK β 2 cedidas por el Dr. José Jimeno y la Dra M^a Carmen Solaz (Instituto de Biomedicina de Valencia. CSIC). pCMV-HA-Laforina y pCDNA-HA-Malina fueron cedidas por el Dr Santiago Rodríguez de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). Las fusiones de ubicuitina a epítipos de 6 histidinas (pCMV-6HisUB, pCMV-6HisUBK48R y pCMV-6HisUBK63R) fueron cedidas por el Dr Erwin knecht (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia). El plásmido pCMV-AMPK α 1 de rata fue cedida por Dr. G. Hardie, (College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee); pRCc/CMV-p53 fue cedida por Dr A. Dickmanns (Universidad de Göttingen) y pDNA3-AMPK β 1 de rata fue cedida por Dr D. Carling (Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London, UK). pCDNA-Mdm2 fue cedido por el Dr. M. Gentry (University of California at San Diego, La Jolla).

3.5 Obtención de construcciones génicas

La obtención de insertos de DNA se llevo a cabo por la amplificación mediante PCR usando un termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf), *Pfu DNA polimerasa* (Stratagene), y un programa de temperatura adecuado a la

MATERIALES Y MÉTODOS

extensión del fragmento y a los requerimientos de secuencia de los oligonucleótidos.

Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de DNA digeridos con el correspondiente enzima de restricción o amplificados por PCR, fueron purificados utilizando el sistema *GENECLEAN TURBO* (MP Biomedicals). Tras la restricción todos los vectores fueron tratados con fosfatasa alcalina (Roche) para desfosforilar los extremos 5' y aumentar la eficiencia de clonación evitando religación de extremos cohesivos, que también están presentes, aunque en bajo porcentaje, cuando se efectúan restricciones con enzimas no compatibles. Para la construcción de los plásmidos se utilizó T4 DNA ligasa (Roche) y/o DNA Quick ligasa (New Englan Biolabs). Se uso *Escherichia coli* DH5 α electrocompetente como cepa hospedadora. Se creció en medio LB, a 37 $^{\circ}$ C y con agitación continua en un agitador orbital a 200 r.p.m. Los medios sólidos se prepararon con agar al 2% (p/v).

E. coli se transformó mediante electroporación a 1.700 voltios y la extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando *illustraTM Plasmid Prep Mini Spin Kit* (GE healthcare). Para la obtención de DNA a gran escala para su uso en la transfección de células de mamífero se utilizó *PowerPrepTM HP Plasmid Midiprep kit* (MARLIGEN). El DNA se diluyó en tampón de carga 6 x (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) para su análisis en gel de agarosa D-1: media EEO (Pronadisa) al 0,7% (p/v) en tampón TAE [Tris 0,04 M, ácido acético 6% (v/v), EDTA 0,05 M pH 8,0].

3.5.1 Clonación de subunidades de la partícula 19S

pACT2-PSMD11 fue obtenido en un rastreo de doble híbrido de una genoteca de músculo esquelético humano y presenta la ORF completa en pauta con el domino de activación de la transcripción (GAD; *Gal4 activation domain*) del plásmido pACT2 (Legrain et al., 1994). La construcción pCMV-myc-PSMD11 fue obtenida mediante subclonación de PSMD11 en pCMV-myc partir de pACT2-PSMD11 por restricción con SfiI y XhoI. La construcción pGEX6PI-PSMD11 fue obtenida mediante subclonación de

MATERIALES Y MÉTODOS

PSMD11 en pGEX6P1 a partir de pACT2-PSMD11 por restricción con SmaI y XhoI. La construcción pBTM116-PSMD11 fue obtenida mediante subclonación de PSMD11 en pBTM116 a partir de pACT2-PSMD11 por restricción con BamHI y Sall.

Para obtener la construcción pBTM116-PSMD11 (1-311) que presenta el dominio N-terminal de PSMD11, se efectuó una amplificación por PCR a partir de pACT2-PSMD11 usando los Oligonucleótidos PSMD11-5 y PSMD11-2 (Tabla 3). El fragmento de PCR fue subclonado por restricción en BamHI y XhoI en pBTM116. Después se comprobó que el fragmento era correcto mediante secuenciación. De manera similar, y usando los oligonucleótidos PSMD11-3 y PSMD11-4 (Tabla 4) se amplificó el dominio C-terminal PSMD11 (312-422) para obtener pBTM116-PSMD11 (312-422). Este fragmento de PCR fue subclonado por restricción en EcoRI and XhoI.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados. Los nuevos sitios de restricción y los codones que introducen una mutación están subrayados. Los codones de inicio y parada están en rojo y negrita

NOMBRE	SECUENCIA
Alpha2-11:	5'-CTT <u>CGA ATT CGA</u> ATG GCT GAG AAG CAG AAG CAC G-3'
Alpha2-2:	5'-G CGG <u>GTC GAC</u> TTA GTA TAA ACT GTT CAT CAC TTC TGA TTC-3'
Alpha2-3:	5'-CGC <u>GGG ATC CGT</u> ATG GCT GAG AAG CAG AAG CAC G-3'
Alpha2-4:	5'-GCC <u>GGT CGA CTT</u> TCA ACG GGC TAA AGC AGT GAT AAG-3'
Alpha2-RD:	5'-GGG <u>CGA ATT CGG</u> AGT GGT GAC CCT CAA GAC CAG C-3'
Beta2-2	5'-CT CGG <u>TCG ACT</u> TCA AAT GGG CTT GTA TAG CAG A-3'
Beta2-6:	5'-CGA <u>GCT CGA GAG</u> GGG TGA GCT GGA AAG GTC TCT-3'
Beta2-7	5'-ACT <u>GGA ATT CGA</u> ATG GGA AAC ACC ACC AGC GAC-3'
Beta2-9	5'-ACT <u>CGA ATT CCA</u> GGG CCT TAT GGT CAA GAA-3'
CIDEA-1	5'-ACT <u>GGA ATT CGA</u> ATG GAG GCC GCC CGG GAC TAT GC-3'
CIDEA-2	5'-CGA <u>GCT CGA GAG</u> CTA TCC ACA CGT GAA CCT GCC CTT GG-3'
CSN2-1:	5'-G G <u>GGG ATC CTT</u> ATG TCT GAC ATG GAG GAT GAT TTC ATG-3'
CSN2-2:	5'-CCC <u>GTC GAC</u> TTA AGC CAG TTT ACT GAC TAC AGC C-3'
pGEX3'-seq-2	5'-CCT CTG ACA CAT GCA GCT CCC GG-3'

MATERIALES Y MÉTODOS

pGEX5'-seq-1	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'
PSMD11-2:	5'-GAC <u>CCT CGA GCT</u> ATG CCC GGT AAT CTG TCA GAG C-3'
PSMD11-3:	5'-G GCG <u>GAA TTC</u> GAG CTC CGG GAT GAC CCA ATC-3'
PSMD11-4:	5'-GA CCC <u>TCGA GCT</u> ATG TCA GTT TCT TGG CTT TG-3'
PSMD11-5:	5'-GCA <u>TGG ATC CCG</u> ATG GCG GCG GCGGCG GTGGTG-3'
PSMD11S14-1	5'-GTG GAG TTC CAG AGA GCC CAG <u>GCT</u> CTA CTC AGC ACC GAC CGG GAG GCC -3'
PSMD11S14-2	5'-GGC CTC CCG GTC GGT GCT GAG TAG <u>AGC</u> CTG GGC TCT CTG GAA CTC CAC-3'
PSMD11S272-1	5'-GAA GAT GTC CAG GCT TTG GTG <u>GCC</u> GGG AAG CTT GCA CTT CGG TAT GCA-3'
PSMD11S272-2	5'-TGC ATA CCG AAG TGC AAG CTT CCC <u>GGC</u> CAC CAA AGC CTG GAC ATC TTC-3'
PSMD11S366-1	5'-GCC GAC GTG GAA AGG AAA TTA <u>GCA</u> CAG ATG ATT CTT GAC AAG AAA TTT C-3'
PSMD11S366-2	5'-G AAA TTT CTT GTC AAG AATCAT CTG <u>TGC</u> TAA TTT CCT TTC CAC GTC GGC-3'
PSMD11S79-1	5'-TAT GTA CGA CCC TTC TTG AAT <u>GCC</u> ATC AGC AAG GCT AAA GCA GCT CGC-3'
PSMD11S79-2	5'-GCG AGC TGC TTT AGC CTT GCT GAT <u>GGC</u> ATT CAA GAA GGG TCG TAC ATA-3'
PSMD12-1:	5'-GGCT <u>GAA TTC</u> ATG GCG GAC GGC GGC TCG GAG-3'
PSMD12-2:	5'-G ATC GTC GAC TTA TTG TAG ATT ATG TAT CAT C-3'
PSMD13-3:	5'-GGG CCA TGG AGA ATT CTT ATG AAG GAC GTA CCG GGCT TCC-3'
PSMD13-4:	5'-GG GCT CGA GCT AGG TGA GGA TGT CAT GGG CCT G-3'
PSMD14-1:	5'-G CCC <u>CGA ATT CGG</u> ATG GAC AGA CTT CTT AGA CTT GG-3'
PSMD14-2:	5'-GA CCC TCG AGT TAT TTA AAT ACG ACA GTA TCC-3'

Para la obtención de los mutantes puntuales de PSMD11 en las serinas 14, 79, 272 y 366 y su cambio a alanina, se efectuó mutagénesis dirigida mediante amplificación por PCR. Se usaron los oligonucleótidos PSMD11S14-1/2, PSMD11S79-1/2, PSMD11S272-1/2 y PSMD11S366-1/2 que presentaban los cambios nucleotídicos pertinentes, en combinación con los oligos pGEX5'-seq-1 pGEX3'-seq-2 (Tabla 4), los cuales hibridan en secuencias flanqueantes al sitio de clonación múltiple del plásmido pGEX6PI. Las reacciones de PCR se efectuaron sobre el molde pGEX6PI-PSMD11 usando el oligo de cada mutación con denominación (-2) y pGEX5'-

MATERIALES Y MÉTODOS

seq-1 y el oligo de cada mutación con denominación (-1) y pGEX3'-seq-2. Después los fragmentos resultantes se purificaron a partir de migración en gel de agarosa del 1%. Las parejas de fragmentos adecuadas se sometieron a PCR en presencia de los oligonucleótidos pGEX5'-seq-1 y pGEX3'-seq-2 para obtener el fragmento de PSMD11 completo con la mutación correspondiente. Estos fragmentos fueron purificados y sometidos a restricción SmaI y XhoI, clonados en pGEX6PI y verificados mediante secuenciación.

La construcción pBTM116-PSMD12, que alberga la subunidad PSMD12 de la partícula 19S del proteasoma, fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir de una genoteca de cDNA de cerebro humano PCR usando los oligonucleótidos PSMD12-1 y PSMD12-2 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y SalI en el plásmido pBTM116 y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pBTM116-PSMD13, que alberga la subunidad PSMD13 de la partícula 19S del proteasoma, fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir de un plásmido cedido por el Dr Dietbert Neumann (*Institute of Cell Biology*, Zurich, Suiza) usando los oligonucleótidos PSMD13-3 y PSMD13-4 (Tabla 4), el fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y SalI en el plásmido pBTM116 y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pACT11-PSMD14, que alberga la subunidad PSMD14 de la partícula 19S del proteasoma, fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir de una genoteca de cDNA de músculo esquelético humano usando los oligonucleótidos PSMD14-1 y PSMD14-2 (Tabla 4), el fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y XhoI en el plásmido pACT11 y comprobado mediante secuenciación.

3.5.2 Clonación de subunidades de AMPK

pACT2-AMPK γ 1 fue obtenido en un rastreo de doble híbrido en una genoteca de músculo esquelético humano y presenta la ORF completa en pauta con el dominio de activación de la transcripción (GAD; *Gal4 activation domain*) del plásmido pACT2 (Legrain et al., 1994). La construcción

MATERIALES Y MÉTODOS

pCMV-myc-AMPK γ 1 fue obtenida mediante subclonación de AMPK γ 1 en pCMV-myc a partir de pACT2-AMPK γ 1 por restricción con EcoRI y XhoI.

La construcción pCMV-myc-AMPK α 2T172A fue obtenida mediante subclonación de AMPK α 2T172A en pCMV-myc a partir de pUC-AMPK α 2T172A por amplificación por PCR usando los oligonucleótidos alpha2-11 y alpha2-4 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y Sall en el plásmido pCMV-myc y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pCMV-myc-AMPK α 2KD que presenta el dominio quinasas (residuos 1 a 312) fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pCMV-Myc-AMPK α 2 usando los oligonucleótidos alpha2-11 y alpha2-2 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y Sall en el plásmido pCMV-myc con restricción EcoRI y XhoI y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pCMV-myc-AMPK α 2RD contiene el dominio de autoinhibición (AID) y el dominio regulador (RD) (residuos 313 a 552), fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pCMV-Myc-AMPK α 2 usando los oligonucleótidos alpha2-RD y alpha2-4 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y Sall en el plásmido pCMV-myc con restricción EcoRI y XhoI y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pCMV-myc-GBD que presenta el fragmento N-terminal de AMPK β 2 (residuo 1 al 185) y contiene el dominio de unión a glucógeno (GBD) fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pCMV-Myc-AMPK β 2 usando los oligonucleótidos beta2-7 y beta2-6 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y XhoI en el plásmido pCMV-myc con restricción EcoRI y XhoI y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pCMV-myc-ASC que presenta el fragmento C-terminal de AMPK β 2 (residuos 186 al 271) y contiene el dominio de unión a las subunidades AMPK γ y AMPK α (ASC) fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pCMV-Myc-AMPK β 2 usando los oligonucleótidos beta2-9 y beta2-2 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue

MATERIALES Y MÉTODOS

clonado por restricción con EcoRI y SalI en el plásmido pCMV-myc con restricción EcoRI y SalI y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pCMV-myc-AMPK β 1 de rata fue obtenida mediante subclonación por restricción SfiI y BglII a partir del plásmido pACTII-AMPK β 1 en el plásmido pCMV-myc.

La construcción pCDNA4/HisMaxA-AMPK β 2 fue obtenida mediante subclonación por restricción BamHI a partir del plásmido pCMV-Myc-AMPK β 2 en el plásmido pCDNA4/HisMaxA.

3.5.3 Clonación de otras proteínas

La construcción pFlagCMV-CIDEA fue obtenida mediante amplificación por PCR de CIDEA a partir de una genoteca de cDNA de músculo esquelético usando los oligonucleótidos CIDEA-1 y CIDEA-2 (Tabla 4). El fragmento de PCR fue clonado por restricción con EcoRI y XhoI en el plásmido pFlagCMV con restricción EcoRI y SalI y comprobado mediante secuenciación.

La construcción pBTM116-CSN2, que alberga la subunidad CSN2 de “COP9 Signalosoma”, fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir de una genoteca de cDNA de músculo esquelético humano usando los oligonucleótidos CSN2-1 y CSN2-2 (Tabla 4), el fragmento de PCR fue clonado por restricción con BamHI y SalI en el plásmido pBTM116 y comprobado mediante secuenciación.

4 Análisis de proteínas

4.1 Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Western Blot)

Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE usando geles de diferentes porcentajes de poliacrilamida (del 8 al 12%). Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 2 x [Tris·HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, ditiotreitol (DTT) 31 mg/mL] y se hirvieron durante 3 minutos. La electroforesis se realizó en un sistema *mini-protein Electrophoresis System* (Bio-

MATERIALES Y MÉTODOS

Rad) a 15-20 miliamperios constantes por gel y en tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v).

La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (*Immobilon Transfer Membrane*, Millipore) durante una hora (para geles de 0,75 mm de grosor) o 90 minutos (para geles de 1,5 mm de grosor) a 100 voltios constantes, y en tampón compuesto por glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% (v/v).

El bloqueo de la membrana se hizo en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T [Tris·HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, *Tween*-20 0,1 % (v/v)] durante 45 min a temperatura ambiente en agitación, o durante toda la noche a 4° C. Los anticuerpos usados en las reacciones de inmunodetección se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE. Se especifica la procedencia, la dilución utilizada, el tipo de anticuerpo y el anticuerpo secundario que necesitan. (*) En lugar de diluirse en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T, se diluyeron en BSA al 5% (p/v) en PBS-T [NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 4 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4, *Tween*-20 0,1 % (v/v)].

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Tipo	Anticuerpo Secundario
Anticuerpos primarios				
Anti-AMPK α	Cell Signaling	1:1000	policlonal	Anti-conejo
Anti-fosfo-AMPK α (T172P)	Cell Signaling	1:1000	policlonal	Anti-conejo
Anti-ACCpSer79	Cell Signaling	1:1000	policlonal	Anti-conejo
Anti-ACC	Cell Signaling	1:1000	policlonal	Anti-conejo
Anti-AMPKpan β	Dr. G. Hardie	1:1000	policlonal	Anti-oveja
Anti-AMPK β 1/2	Cell Signaling	1:1000	monoclonal	Anti-conejo
Anti- β 2 (proteasoma 20S)	Biomol	1:1000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-AMK γ 1	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-GFP *	Immunokontakt	1:5.000	policlonal	Anti-conejo
Anti-HA	Roche	1:10000	monoclonal	Anti-ratón

MATERIALES Y MÉTODOS

Anti-HA-HRP	Sigma	1:5.000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-Laforina	Santiago Rodriguez de Córdoba	1:2000	monoclonal	Anti-raton
Anti-MDM2*	Santa Cruz	1:500	Monoclonal	Anti-ratón
Anti-myc	Sigma	1:10000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-myc-HRP	Sigma	1:5000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-p53	Exbio	1:6000	Monoclonal	Anti-ratón
Anti-ramificacion K48 poliubicitina*	Genentech	1:1000	monoclonal	Anti-IgG-humana
Anti-ramificacion K63 poliubicitina*	Genentech	1:1000	monoclonal	Anti-IgG-humana
Anti-S1(Rpn2)(proteasoma 19S)	Biomol	1:1000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-Tubulina	Santa Cruz	1:3000	Monoclonal	Anti-ratón
Anticuerpos secundarios				
Alexa-fluor 488 (anti-conejo)	Invitrogen	1:500		x
Anti-IgG-humana	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	policlonal	x
Anti-Mouse IRDDye 680nm	LICOR Biosciences	1:5000	policlonal	x
Anti-Rabbit IRDDye 800nm	LICOR Biosciences	1:5000	policlonal	x
Anti-conejo-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000	policlonal	x
Anti-ratón-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000	policlonal	x
Texas Red (anti-ratón)	Invitrogen	1:500		x

Los anticuerpos HRP fueron detectados utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL o ECL Plus (Amersham Biosciences) y la imagen se obtuvo mediante revelado de película fotográfica o mediante un lector electrónico LAS-3000 (FUJIFILM) y fue analizada y densitometrada con el programa *Image Gauge V4.0* (FUJIFILM). Los anticuerpos IRDDye fueron detectados mediante un lector laser de dos canales *Odissey* (LI-COR).

4.2 *Desnudado de membranas (Stripping)*

En los casos donde se necesitó revelar frente a más de un anticuerpo cuyas señales se solapan, las membranas se sometieron a *Stripping*. Para ello, se incubaron durante 30 min a 50° C en SDS 2% (p/v), Tris·HCl 65 mM pH 6,8 y β -mercaptoetanol 0,7% (v/v). Después se realizaron tres lavados en TBS-T durante 10 min y se procedió de nuevo a bloquear la membrana y a incubarla con el nuevo anticuerpo.

4.3 *Electroforesis bidimensional*

Las células se transfectaron con los correspondientes plásmidos usando Lipofectamina 2000 o fosfato de calcio. A las 24h se congelaron las células en nitrógeno líquido y se hicieron los extractos en tampón de lisis [urea 9,7 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM]. La cantidad de proteína total se valoró mediante el método Bradford [Bio-Rad *Protein Assay* (Bradford, 1976)]. Para el tratamiento con λ -fosfatasa, las células se recogieron en tampón λ -fosfatasa con MnCl_2 2 mM y los extractos se cuantificaron con el sistema *Dc Protein Assay*, (Bio-Rad). 50 μg de extracto en tampón λ -fosfatasa conteniendo MnCl_2 2 mM se trataron a 30° C durante 30 min con 50 unidades de λ -fosfatasa (New England Biolabs). Una vez transcurrida la reacción, el tampón λ -fosfatasa se diluyó en 4 volúmenes de tampón de lisis.

Análisis bidimensional: Para el isoelectroenfoque (IEF) se usó un instrumento IPGphor (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) con tiras IPG *ImmobilineTM DryStrip* de 7cm de pH adecuado. Fueron cargados entre 12 y 50 μg de proteína total en 100 μL de urea 9,7 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM, tampón IPG 0,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,5% (v/v). Las tiras fueron previamente hidratadas con un tampón compuesto por urea 8 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 20 mM, tampón IPG 0,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,5% (v/v), durante toda la noche anterior, a temperatura ambiente por hidratación pasiva. El IEF se realizó en las siguientes condiciones: 500 V

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 30 min o 250 V/h, 1.000 V durante 30 min o 500 V/h y 5.000 V durante 80 min o 6.666 V/h. Una vez finalizado, las tiras se guardaron a -20 °C hasta la realización de la segunda dimensión. Antes de llevarla a cabo, las tiras se equilibraron en tampón compuesto por Tris·HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, SDS 2% (p/v), glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v) y DTT 20 mM, durante 15 min a temperatura ambiente y, seguidamente, en Tris·HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, SDS 2% (p/v), glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v) y yodoacetamida 25 mg/mL, durante 15 min a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó mediante un SDS-PAGE en geles de 1,5 mm de grosor, efectuando el sellado de la tira mediante agarosa en tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v) y efectuando un *western blot* adecuado a las características de la proteína ensayada.

5 Doble híbrido

La técnica de doble híbrido fue diseñada por Stanley Fields (Fields and Song, 1989) para identificar proteínas que interaccionan en un sistema *in vivo*. Esta técnica se basa en el carácter modular de factores de transcripción que presentan dos dominios funcionales independientes: un dominio de unión a secuencias específicas de DNA y un dominio activador de la transcripción. El dominio de unión a DNA dirige al factor de transcripción a unas secuencias específicas de un promotor, y el dominio de activación facilita el ensamblaje del complejo de iniciación, permitiendo la transcripción del gen reportero. De este modo, en el doble híbrido se usan dos proteínas híbridas recombinantes. La proteína de interés (proteína cebo) se fusiona a un dominio de unión al DNA, y la segunda proteína híbrida (proteína presa) se fusiona a un dominio de activación de la transcripción. La asociación física entre las proteínas cebo y presa permite la formación de un heterodímero con capacidad de unir DNA específicamente y de activar la transcripción génica. La reconstitución del factor de transcripción se produce por una unión física no covalente entre la proteína cebo y la proteína presa. Esta unión se ensaya en una levadura con un fondo genético particular, que contiene genes reporteros bajo el control de la UAS (*Upstream Activation Sequence*) correspondiente al dominio de unión al DNA

MATERIALES Y MÉTODOS

(LexA o Gal4) del vector en el que se construye la proteína cebo. La mayoría de cepas existentes tienen dos genes reporteros independientes: un gen que permite una selección nutricional (biosíntesis de histidina, *HIS3*) y otro que codifica para una enzima cuya actividad es cuantificable (*lacZ*). Este gen codifica para la enzima β -galactosidasa que degrada la lactosa y otros β -galactósidos como el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactósido (X-gal) o el orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG). El X-gal y el ONPG, cuando son degradados por la β -galactosidasa generan un compuesto coloreado (azul y amarillo respectivamente) cuantificable por colorimetría.

5.1 Ensayos β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa se ensayó en filtro y en células permeabilizadas. Para los ensayos en filtro (Yang et al., 1992), se crecieron clones individuales en medio SC sólido con los requerimientos necesarios para mantener los plásmidos. Las células se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Millipore) y se congelaron a -80°C para permeabilizarlas. A continuación, el filtro se puso en contacto con tampón Z [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y β -mercaptoetanol 2,7% (v/v)] y el sustrato artificial X-Gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (Roche Applied Science)] 1 mg/mL, y se observó la aparición de color azul sobre los clones a 30°C .

Los ensayos cuantitativos se realizaron con la cantidad de células equivalente a 0,5 unidades de densidad óptica a 600 nm (D.O._{600}), en 1 mL de tampón Z con 25 μL de SDS 0,1% (p/v) y 25 μL de cloroformo. Como sustrato se utilizó 200 μL de ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosido; SIGMA) 4 mg/mL y la reacción se paró con 500 μL de Na_2CO_3 1 M a tiempos controlados. El color amarillo desarrollado a 30°C se midió a D.O._{420} y se expresó en unidades Miller, aplicando la siguiente transformación:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{\text{D.O.}_{420} \times 1.000}{t \text{ (min)}} \times 2$$

En los casos en los que se ha medido la actividad β -galactosidasa en condiciones de alta glucosa [4% (p/v) glucosa], una alícuota de las células ha

MATERIALES Y MÉTODOS

sido lavada dos veces con H₂O y cambiadas a un medio de baja glucosa [0,05% (p/v) glucosa] durante tres horas, obteniéndose después una nueva medida de actividad β -galactosidasa.

6 Ensayo de coimmunoprecipitación en líneas celulares de mamífero

El día anterior a la transfección se sembraron 2.000.000 células HEK293T en placas de 100 mm de diámetro. Las células se transfectaron con los plásmidos correspondientes para cada ensayo mediante el protocolo del fosfato de calcio. 24 horas después de la transfección, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis [Tris·HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, EDTA 2 mM, glicerol 15% (v/v), nonidet P40 (*nonylphenyl-polyethylene glycol*) 1% (v/v), una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y PMSF 1 mM]. Las células se lisaron por sucesivos ciclos de congelación y descongelación. Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min y la fracción soluble se recogió y se cuantificó utilizando el sistema *Dc Protein Assay* (Bio-Rad). Se incubó 300 μ g de extracto crudo con el anticuerpo pertinente (anti-HA, anti-Myc o IgG inespecífica) en un volumen final de 500 μ L (completado con tampón de lisis) durante toda la noche a 4° C. Tras esto, los 500 μ L fueron incubados durante 4 horas a 4° C en presencia de 50 μ L de proteína A-sefarosa IPA-300 (*RepliGen*). Tras varios lavados de 10 min a 4° C con PBS y con PBS + NP-40 0,05% (v/v), tanto los extractos crudos como lo retenido en la matriz de proteína A-Sefarosa fue analizado mediante *western blot*.

7 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La expresión y purificación de las proteínas de fusión a GST en plásmido pGEX6PI, expresadas en *E. coli* BL21-RIL, se llevó a cabo a partir de 250 mL cultivo bacteriano en LB con ampicilina. Se creció un pre-inoculo de 50 mL de transformantes toda la noche a 37° C. se efectuó una dilución 1/100 del pre-inoculo y se añadió 0,1 mM de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido

MATERIALES Y MÉTODOS

(IPTG) y se dejó crecer a 37 °C en agitación orbital a 250 rpm hasta que la D.O.₆₀₀ alcanzó un valor de 0,5. Las células se recogieron y resuspendieron en 20 mL de tampón de sonicación [Hepes·NaOH 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, glicerol 10% (v/v), Triton X-100 0,1% (v/v), DTT 2 mM, PMSF 2 mM, y una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science)]. Las células se rompieron por sonicación en 15 ciclos de 30 segundos a 11 micrones alternados por 1 min en hielo. Las proteínas de fusión se purificaron pasando los extractos por una columna de glutation-sefarosa (Amersham Biosciences) de 1 mL de volumen de lecho (Garcia-Gimeno, 2003). Las proteínas se eluyeron de la columna con glutatión 25 mM y las muestras se guardaron a -80° C.

8 Ensayos de fosforilación *in vitro*

Para los ensayos de fosforilación se utilizó tampón compuesto por Hepes·NaOH 20 mM pH 7,0, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM. La reacción se llevó a cabo con 100 mU de AMPK (Upstate), AMP 200 μM y 100 μM de una mezcla 1:4 de γ³²P-ATP (3000 Ci/mmol, proporcionado por Amersham Biosciences) y ATP. Tras 1 hora a 30° C, la reacción se paró calentando las muestras a 95° C durante tres minutos con tampón de carga. A continuación, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, el gel se secó con bomba de vacío a 80° C y se analizó por autorradiografía. Como control de carga también se analizaron por SDS-PAGE cantidades equivalentes de las mismas diluciones de las proteínas utilizadas como sustrato, se tiñeron con tinción Coomassie [Coomassie 0,25% (p/v), metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] y los lavados se hicieron con metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v). Para el análisis de estequiometría de fosforilación, se efectuó el mismo ensayo re-escalado para obtener alícuotas equivalentes a tiempos 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. Una fusión de GST-ACC (cedida por M. Towler, *University of Dundee*) fue usada como control de estequiometría, ya que está demostrado que AMPK solo incorpora 1 mol de fosfato por mol de ACC (Scott et al., 2002). Tras esto, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con tinción Coomassie, siendo cuantificada su cantidad conforme a un estándar,

MATERIALES Y MÉTODOS

mediante análisis informático de imagen. Después los geles se secaron con bomba de vacío a 80° C y se analizaron por autorradiografía y cuantificaron en un lector FLA-5000 (FUJIFILM).

9 Análisis de viabilidad y ciclo celular

Análisis de viabilidad celular: Se usaron MEFs cultivadas en DMEM. A las 24 horas se sustituyó el medio de crecimiento por medio mínimo KH que contenía los agentes químicos o sus disolventes a las concentraciones y tiempos indicados. Tras los tiempos y tratamientos indicados las células fueron levantadas por tripsinización, colectadas junto con los sobrenadantes por centrifugación a 2000 x g y resuspendidas en PBS 1X con 0,5 mg/mL de RNAsa y 50 µg/mL de yoduro de propidio e incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente 30 minutos. La viabilidad se determinó por citometría de flujo con un citómetro *FACScanto flow cytometer* (Becton Dickinson) usando un láser de excitación de 488 nm y detección de fluorescencia de yoduro de propidio a 600 nm.

Análisis de ciclo celular: Se usaron MEFs cultivadas en DMEM. A las 24 horas se sustituyó el medio de crecimiento por medio mínimo Kreps-Henseleit (KH) [NaCl 120mM, MgSO₄ 2,5 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,20 mM, NaHCO₃ 18,5mM, D-Glucosa 10mM HEPES 10 mM, y CaCl₂ 2,45 mM] que contenía los agentes químicos o sus disolventes a las concentraciones y tiempos indicados. Tras los tiempos y tratamientos indicados las células fueron levantadas por tripsinización, colectadas junto con los sobrenadantes por centrifugación a 2000 x g lavadas con PBS 1X y fijadas en etanol al 80% a -20 °C toda la noche. Después fueron centrifugadas y el medio de fijación se sustituyó por PBS 1X con 0,5 mg/mL de RNAsa y 50 µg/mL de yoduro de propidio e incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente 30 minutos. La proporción celular se determinó por análisis con el programa MODFIT de los datos de citometría de flujo, que se obtuvieron como se indica en el párrafo anterior.

10 Determinación de la actividad del proteasoma *in vivo*

Se usaron MEFs de tipo silvestre y dobles mutantes para las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 (α 1 $^{-/-}$ y α 2 $^{-/-}$). Se crecieron en DMEM, 35.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos. A las 24 horas se sustituyó el medio de crecimiento por 100 μ L de medio mínimo Kreps-Henseleit (KH) [NaCl 120mM, MgSO₄ 2,5 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,20 mM, NaHCO₃ 18,5mM, D-Glucosa 10mM HEPES 10 mM, y CaCl₂ 2,45 mM] que contenía los agentes químicos o sus disolventes a las concentraciones y tiempos indicados. Para la medición de la actividad proteasomal, tras el periodo de incubación se adiciono a cada pocillo 100 μ L de reactivo comercial Proteasoma-Glo (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. El funcionamiento de este ensayo de basa en la reacción de proteólisis dependiente de la actividad quimi tripsina del proteasoma sobre el péptido succinyl-leucineleucine-valine-tyrosine-aminoluciferin (Suc-LLVY-aminoluciferina). La proteólisis de este péptido genera un sustrato, que en presencia de ATP y Magnesio es susceptible de ser usado por una proteína luciferasa termoestable para producir luminiscencia. Esta reacción acoplada hace que la tasa proteolítica del proteasoma se acople a la producción de luminiscencia, que fue medida en un lector de placas multipocillo Spectra Max M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Se usaron también HEK293 GFPu-1 cultivadas en DMEM. A las 24 horas se sustituyó el medio de crecimiento por medio mínimo KH que contenía los agentes químicos o sus disolventes a las concentraciones y tiempos indicados. Tras los tiempos y tratamientos indicados las células fueron levantadas por tripsinización y diluidas en PBS IX con inhibidores de proteasas [mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science)]. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo con un citómetro FACScanto flow cytometer (Becton Dickinson) usando un laser de excitación de 488 nm y detección de fluorescencia de GFP a 520 nm.

MATERIALES Y MÉTODOS

II Determinación de la actividad proteasomal *in vitro*

Para medir la actividad del proteasoma 26S *in vitro* usamos un preparado comercial de eritrocitos humanos (Biomol) en combinación con detección de fluorescencia liberada por la proteólisis de caseína-FITC (caseína unida al fluoróforo isotiocianato de fluoresceína) (Sigma). La caseína es una proteína cuya masa molecular es cercana a 25 kDa y que solo puede ser degradada por el núcleo catalítico 20S si es previamente desplegada por la partícula reguladora 19S. Cuando la caseína-FITC es degradada por el proteasoma el fluoróforo se libera y emite fluorescencia (con excitación a 485 nm y emisión a 535 nm). Para la determinación de la actividad de proteasoma 20S *in vitro* se uso un preparado comercial de eritrocitos humanos (*proteasome assay kit*; Biomol), y un péptido succinyl-leucineleucine-valine-tyrosine-aminoluciferin (Suc-LLVY-AMC) como sustrato. Este péptido de pequeño tamaño puede ser degradado por el núcleo catalítico 20S por sí solo, y su degradación libera una molécula fluorescente, la aminoluciferina (con excitación a 360 nm y emisión a 460 nm). Tras efectuar los ensayos de acuerdo con las instrucciones del proveedor, medimos la fluorescencia en un lector de placas multipocillo Spectra Max M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

El ensayo peptidasa en gel fue realizado con proteasomas 20S y 26S. 3µg de proteasomas fueron incubados con DMSO o A-769662 100 µM durante 30 minutos a 37 °C en un tampón tris-HCl 50mM pH 7,5 con DTT 1mM, KCl 40mM, ATP-Mg 1mM y glicerol 2%. El análisis fue realizado llevando a cabo una electroforesis nativa en un gel del 4% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) con DTT 1mM, ATP 1mM, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,1 mM. Las muestras se cargaron usando un tampón Tris-HCl 250 mM pH 7,5 con glicerol al 50% y xileno-cianol FF al 0,007 %. La migración se llevo a cabo a 4º C y 100 voltios durante 2 horas y 30 minutos. Tras esto el gel fue incubado 30 minutos a 30º C en tampón de revelado, que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 5mM, ATP 250 mM y el péptido fluorogénico Suc-LLVY –AMC a 100 µM. La fluerecencia derivada de la proteólisis del péptido fluorogénico dentro del gel fue visualizada usando un transilumador ultravioleta y cámara fotográfica. Después, el gel fue teñido con azul coomassie

12 Análisis de Ubicuitinación *in vivo*

Para estudiar la ubicuitinación de las subunidades de AMPK pusimos a punto un ensayo para el análisis de proteínas ubicuitinadas basado en la expresión de una versión de ubicuitina marcada con 6 residuos de histidina (6xHis-UB) en células de mamífero HEK293 (Kaiser et al., 2005). Para las diferentes condiciones de ensayo se sembraron 2.500.000 células HEK293T en placas de 100 mm de diámetro en medio DMEM. A las 24 horas, las células se transfectaron con la combinaciones de plásmidos correspondientes para cada ensayo mediante el protocolo del fosfato de calcio. Estas combinaciones se componen de los plásmidos que expresan las proteínas necesarias para el ensayo y una proteína fusionada a colas de histidina (pCMV-6xHis-UB, pCMV-6xHis-UBK48R, pCMV-6xHis-UBK63R o pCDNA4/HisMaxA-AMPK β 2). Durante las 36 horas posteriores a la transfección fueron tratadas o no con inhibidores proteasomales a las concentraciones y tiempos indicados. A las 36 horas post-transfección se retiró el medio y se efectuó el lisado sobre las placas a temperatura ambiente con tampón A (HCl-guanidinio 6 M, tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y imidazol 10 mM). El lisado fue retirado mediante rascador y homogeneizado mediante jeringuilla con aguja de 25G. Los lisados se clarificaron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min y la fracción soluble se recogió y se cuantificó utilizando el sistema *Dc Protein Assay* (Bio-Rad). 4 mg de proteína total se incubaron con 100 μ L de matriz de cobalto TALON (Clontech) durante 3 horas a temperatura ambiente en una noria. Cada muestra presentaba un volumen final de 1 mL y 10 mM imidazol. Tras la incubación se efectuaron varios lavados de 15 minutos. Primer lavado con 2 ml de tampón C (HCl-guanidinio 6 M, tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y imidazol 10 mM), y cuatro lavados finales de 2 ml de tampón D (Urea 8 M, tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y imidazol 10 mM). La elución se realizó mediante la adición de tampón de carga 2 x [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, ditiotreitól (DTT) 31 mg/mL] y ebullición de la muestra 5 min. El análisis se realizó por *western blot* usando los anticuerpos adecuados a cada condición experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

13 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Se sembraron células HeLa sobre placas p60 que contenían varios cubres de vidrio. Tras las transfecciones indicadas, fueron incubadas 24 horas a 37°C. Después, fue retirado el medio y, a temperatura ambiente, se efectuaron varios lavados con PBS 1X, las células se fijaron con PFA 4% en PBS 1X durante 10 minutos y la fijación fue bloqueada con glicina 10mM durante 5 min. A continuación las células fueron permeabilizadas con Triton X100 0,5% en PBS 1X durante 5 min. Tras varios lavados con PBS 1X se procedió a bloquear las preparaciones con 10% FBS, 5% leche, 0,5% BSA y 0,1 Triton X100 en PBS 1X durante 5h a 4°C. Posteriormente se procedió a la incubación durante toda la noche a 4°C con Anti-AMPK α o Anti-AMPK β de (Cell signalling) 1/200 en combinación o no con anti-Laforina 1/2000 en solución de bloqueo (Tabla 5). Tras esto, se efectuaron varios lavados con PBS 1X durante 1h a temperatura ambiente y se incubaron las preparaciones durante 1 hora con anticuerpos secundarios fluorescentes *Texas red* (anti-ratón, emisión máxima a 543 nm) y *Alexa-fluor 488* (anti-conejo, emisión máxima a 488nm) (Invitrogen) a dilución 1/500. A continuación se procedió a la tinción de núcleos con la sonda fluorescente *Topro 3* (emisión máxima a 600 nm) en dilución 1/500 en PBS 1X durante 10 minutos y tras varios lavados con PBS 1X se procedió al montaje de las preparaciones con Fluoromount G.

Las imágenes de microscopía fueron tomadas en un microscopio confocal Leica TCS/SP2 (Leica), con un objetivo de inmersión 63X, mediante capas de 2 μ m y zoom de 2,50. Para asegurar la ausencia de interferencias en la señal de emisión de los fluoróforos, se efectuaron dos series de toma de imagen por campo (la primera, imagen de *Alexa-fluor* a 488 nm y *Topro 3* a 600 nm, y la segunda, intensidad de luz transmitida y *Texas red* a 543nm). Se obtuvieron más de 25 campos entre 2 experimentos independientes y se analizaron más de 50 células de cada por condición. El análisis de imagen se realizó con el programa ImageJ 1.43c (programa de uso público desarrollado por Wayne Rasband, NIH, USA). El área total de cada célula fue determinada mediante la imagen de luz transmitida y el área nuclear mediante la segmentación generada por la sonda *Topro 3*. La intensidad de señal total de AMPK de cada célula se obtuvo multiplicando el área de la célula por la intensidad de señal media de esa área. La intensidad de señal

MATERIALES Y MÉTODOS

total de AMPK dentro de cada núcleo se obtuvo multiplicando el área del núcleo por la intensidad de señal media de esa área. La intensidad de señal total de AMPK en el citoplasma se obtuvo como la resta entre la intensidad total de cada célula y la intensidad total de su núcleo. Finalmente se calculó la relación entre la intensidad de AMPK entre el núcleo y citoplasma para cada célula.

Resultados

I) Efecto de AMPK sobre el PROTEASOMA

II) Efecto de UPS sobre AMPK

I) Efecto de AMPK sobre el PROTEASOMA

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

En nuestro laboratorio mediante un escrutinio por doble híbrido se observó que la subunidad AMPK β 2 interaccionaba con la subunidad PSMD11 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11), una subunidad no ATPasa del Lid de la partícula 19S del proteasoma humano. Con objetivo de estudiar con más profundidad la posible relación existente entre AMPK y el proteasoma realizamos una serie de ensayos. Unos dirigidos a concretar la existencia y naturaleza de la interacción entre AMPK y PSMD11, y otros dirigidos a determinar si AMPK es capaz de modular la actividad del proteasoma.

1 Análisis de la interacción física entre AMPK y PSMD11

Inicialmente, comprobamos y cuantificamos mediante doble híbrido si la interacción presente entre AMPK β 2 y la subunidad PSMD11 se hacía extensiva al resto de subunidades de AMPK. Como se muestra en la **Tabla 6**, PSMD11 es capaz de interaccionar también con AMPK α 2, aunque en menor medida que lo hace con AMPK β 2. PSMD11 no es capaz de interaccionar con la subunidad AMPK γ 1.

Tabla 6. Interacción por doble híbrido de PSMD11 con las diferentes subunidades de AMPK. La cepa de levadura TAT7 fue transformada con los plásmidos pBTM116 (vacío), pBTM-AMPK α 2, pBTM-AMPK β 2 and pBTM-AMPK γ 1 y después co-transformada con el plásmido pACT2-PSMD11. El nivel de interacción fue estimado mediante doble híbrido midiendo la actividad β -galactosidasa. Los valores corresponden a las medias de 4-6 transformantes diferentes (la desviación estándar de los valores fue inferior a 15% en todos los casos).

Plásmidos	Unidades β -galactosidasa
pBTM-AMPK α 2 + pACT2-PSMD11	10
pBTM-AMPK β 2 + pACT2-PSMD11	460
pBTM-AMPK γ 1 + pACT2-PSMD11	<1
pBTM116 + pACT2-PSMD11	<1

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

Para confirmar esta interacción llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK293. Transfectamos mediante fosfato de calcio las células HEK293 con dos plásmidos que sobreexpresaban al mismo tiempo HA-AMPK β 2 y myc-PSMD11, o HA-AMPK α 2 y myc-PSMD11 o el control HA-vacio y myc-PSMD11. La inmunoprecipitación se llevo a cabo con anticuerpos específicos anti-HA y la inmunodetección con anticuerpos específicos anti-myc. Como se puede observar en la **Figura 11**, PSMD11 co-inmunoprecipita tanto con HA-AMPK α 2 como HA-AMPK β 2, y lo hace de manera específica, puesto que los controles con HA-vacio y las inmunoprecipitaciones sin anticuerpo no presentan señal.

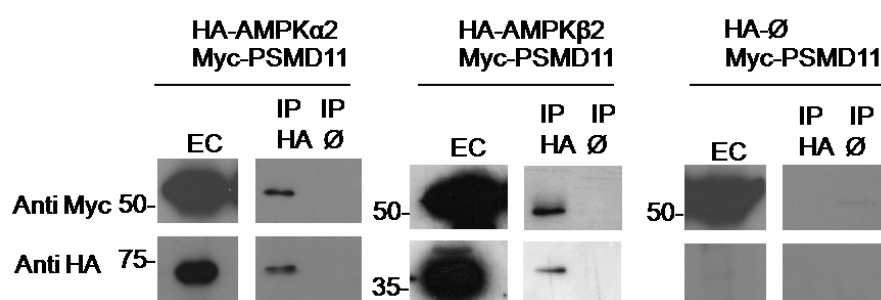


Figura 11. PSMD11 co-inmunoprecipita con AMPK α 2 y AMPK β 2. Los extractos proteicos (300 μ g) se obtuvieron a partir de células HEK293 transfectadas con las correspondientes combinaciones de plásmidos. Se usó 1 μ l de anti-HA o sin anticuerpo (\emptyset) para inmunoprecipitar los extractos (IP). Las proteínas inmunoprecipitadas y las proteínas sobreexpresadas en los extractos crudos (EC; 30 μ g) se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-myc (paneles superiores) y anti-HA (paneles inferiores).

PSMD11 presenta un dominio PCI (*P*roteasome, *C*OP9, *e*IF3) en su región C-terminal, que está también presente en subunidades similares de los complejos COP9/signalosoma (implicado en señalización intracelular) y eIF3 (que media en la iniciación de la traducción). Este dominio está implicado en interacciones proteína-proteína y parece ser esencial para el correcto ensamblaje del Lid (Glickman and Ciechanover, 2002) (**Figura 12**). También se encuentra en otras subunidades del Lid (PSMD12, PSMD13,

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

PSMD3 y PSMD6). Por ello, para profundizar en el modo en que PSMD11 y AMPK interactúan y ver si AMPK era susceptible de interactuar con otras subunidades de Lid o del COP9/signalosoma, a través del dominio PCI, realizamos varios ensayos de doble híbrido. Por un lado, ensayamos la interacción AMPK β 2 y los fragmentos de PSMD11 N-terminal (residuos 1-331; que carece del dominio PCI) y PSMD11 C-terminal (332-422; que contiene el dominio PCI completo). Por otro lado, estudiamos la interacción entre AMPK β 2 y tres subunidades del Lid (PSMD12, PSMD13, PSMD14 solo las dos primeras con dominio PCI) y entre AMPK β 2 y la subunidad CSN2 del COP9/signalosoma, que es paróloga a PSMD11 [con elevada identidad de secuencia (Sharon et al., 2006)]. Los datos quedan resumidos en la **Tabla 7**. Como puede observarse, AMPK β 2 interactúa con el fragmento C-terminal (residuos 332-422) de PSMD11, el cual contiene al dominio PCI, no obstante la intensidad de la interacción es 3 veces menor que con la forma completa (residuos 1-422) de PSMD11. Por otra parte, ninguna de las otras subunidades (PSMD12, PSMD13, PSMD14 y CSN2) interactúa con AMPK β 2.

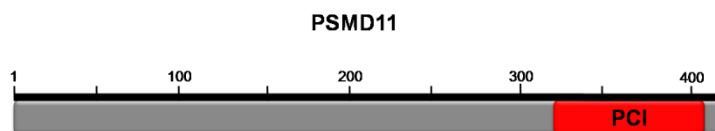


Figura 12. Esquema de la estructura primaria PSMD11. En rojo el dominio dominio PCI (*Proteasome*, *COP9*, *eIF3*), que está implicado en interacciones proteína-proteína.

1) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

Tabla 7. Interacción por doble híbrido de AMPK β 2 con los diferentes dominios de PSMD11 y con PSMD12, PSMD13, PSMD14 y CSN2. La cepa de levadura CTY10.5d fue transformada con el plásmido pACT2-AMPK β 2 y después co-transformada con los plásmidos pBTM116-PSMD11 (1-422, completo), pBTM116-PSMD11 (1-311, N-terminal) o pBTM116-PSMD11 (312-422, C-terminal, dominio PCI), pBTM116-PSMD12, pBTM116-PSMD13 o pBTM116-CSN2. De manera similar la misma cepa de levadura fue transformada con el plásmido pBTM116-AMPK β 2 y después co-transformada con los plásmidos pACT2-PSMD14. Los valores corresponden a las medias de 4-6 transformantes diferentes (la desviación estándar de los valores fue inferior a 15% en todos los casos).

Plásmidos	Unidades β -galactosidasa
pACT2-AMPK β 2 + pBTM116-PSMD11 (1-422)	90
pACT2-AMPK β 2 + pBTM116-PSMD11 (1-311)	<1
pACT2-AMPK β 2 + pBTM116-PSMD11 (312-422)	30
pACT2-AMPK β 2 + pBTM116-PSMD12	<1
pACT2-AMPK β 2 + pBTM116-PSMD13	<1
pACT2-AMPK β 2 + pBTM116-CSN2	<1
pBTM116-AMPK β 2 + pACT2-PSMD14	<1

Por tanto, tomados en conjunto, estos datos indican que PSMD11 es capaz de interactuar con AMPK β 2. Además, la interacción entre AMPK β 2 y PSMD11 parece muy específica y no depende únicamente de la presencia del dominio PCI, ya que otras proteínas que lo presentan (incluida CSN2 que es paróloga de PSMD11) no interactúan con AMPK β 2.

2 Análisis de la fosforilación de PSMD11 por AMPK *in vitro*

Dado que tanto AMPK α como AMPK β interactúan con PSMD11, nos propusimos comprobar si AMPK era capaz de fosforilar a PSMD11 *in vitro*. Para ello purificamos la fusión GST-PSMD11 a partir de bacterias *E. coli* BL21-RIL mediante una columna con matriz de glutatión-sefarosa. En primer lugar comprobamos si AMPK fosforilaba de manera específica a PSMD11 llevando a cabo la reacción de fosforilación *in vitro* en presencia y ausencia de AMP, un activador alostérico de AMPK (**Figura 13A**). Como puede observarse, la fosforilación de PSMD11 por AMPK es dependiente de

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

la presencia de AMP, lo que indica que es específica. En segundo lugar nos planteamos determinar si esta fosforilación sucedía sobre un solo residuo o varios. Para ello llevamos a cabo una cinética de fosforilación *in vitro* en condiciones similares a las anteriores y comprobamos la estequiometría de unión de fosfato a PSMD11 por AMPK. Comparamos la fosforilación de una fusión GST-ACC (residuos 60 a 94) (cedida por M. Towler, *University of Dundee*), que solo presenta un sitio de fosforilación por AMPK (Scott et al., 2002), con la fosforilación de PSMD11 a tiempo 0, 5, 10, 20, 40, y 60 minutos. La cuantificación de los moles de fosfato incorporados en cada tiempo fueron determinados respecto de una recta patrón mediante captura de imagen con el lector FLA-5000 y el análisis con el programa *Image Gauge V4.0* (FUJIFILM). La cuantificación de los moles proteína en cada banda fue determinada respecto de un estándar de proteínas mediante captura de imagen con el lector LAS-3000 y el análisis con el programa *Image Gauge V4.0* (FUJIFILM). Como puede observarse (**Figura. 13B**), PSMD11 incorpora menos fosfato que GST-ACC. Ello indica que PSMD11 tiene, probablemente, un solo sitio de fosforilación potencial por AMPK. También puede observarse que la reacción de marcaje en nuestras condiciones de ensayo tiene un rendimiento bajo para las dos fusiones, ya que GST-ACC incorpora un máximo de 0,2 moles de fosfato por mol de proteína, cuando en condiciones óptimas es cercano a 0,5 moles de fosfato por mol de proteína (Scott et al., 2002).

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

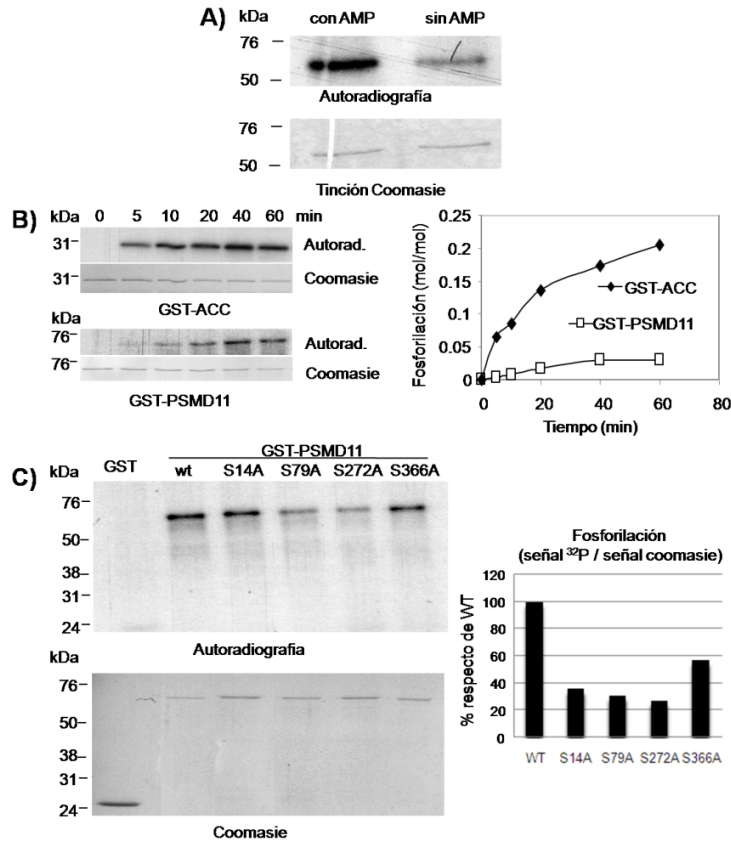


Figura 13. Fosforilación *in vitro* de PSMD11 por AMPK. A) AMPK fosforila a GST-PSMD11 de manera dependiente de AMP. GST-PSMD11 (300 ng) expresado en *E. coli* BL21-RIL fue fosforilado *in vitro* usando 100 mUnidades de AMPK (Upstate) y [γ - 32 P] ATP, en presencia de 200 μ M de AMP. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE, teñidas en azul Coomassie y analizadas por autoradiografía. B) análisis de estequiometría de fosforilación *in vitro* de GST-ACC (control) y GST-PSMD11 por AMPK. Se retiraron alícuotas de las mezclas de reacción a los tiempos indicados para ser analizadas por SDS-PAGE y cuantificar la incorporación de 32 P mediante lector electrónico FLA-5000 (FUGIFILM) y la cantidad de proteína mediante lector electrónico LAS-3000 (FUGIFILM). Los valores se expresan como mol de 32 P incorporado por mol de proteína. C) Del mismo modo que en (A), GST-PSMD11, GST-PSMD11S14A, GST-PSMD11S79A, GST-PSMD11S272A y GST-PSMD11S366A fueron sometidos a fosforilación *in vitro* por AMPK y analizados como en (B). Los valores se expresan como relación señal 32 P/señal azul coomassie respecto de la proteína silvestre.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

En tercer lugar, y dado que la fosforilación PSMD11 por AMPK parecía implicar a un solo residuo, buscamos en PSMD11 los posibles sitios consenso de fosforilación por AMPK [$\Phi\beta\text{XXXS/TXXX}\Phi$, donde Φ es un residuo hidrofóbico (leucina, metionina, isoleucina, fenilalanina o valina), β es un residuo básico (arginina, lisina y histidina) y X puede ser cualquier residuo, siendo S y T, serina y treonina respectivamente (Towler and Hardie, 2007)] y observamos que existían dos, la serina 14 (FQRAQS₁₄LLST) y la serina 366 (VERKLS₃₆₆QMIL). Además, un análisis global llevado a cabo recientemente indica que las serinas 14, 79, y 272 de PSMD11 están fosforiladas en ciertas condiciones (Wang et al., 2007). Como dato adicional, tras alinear las secuencias de PSMD11 entre humano (*homo sapiens*), chimpancé (*Pan troglodytes*), toro (*Bos taurus*), ratón (*Mus musculus*) y pez cebra (*Danio rerio*), vimos que estas 4 serinas se encuentran conservadas en las 5 especies (**Figura 14**). Así pues, construimos los mutantes puntuales a alanina de las cuatro serinas (serinas 14, 79, 272 y 366) y a continuación, realizamos el ensayo de fosforilación *in vitro* en condiciones similares a las anteriores sobre GST-PSMD11, GST-PSMD11S14A, GST-PSMD11S79A, GST-PSMD11S272A y GST-PSMD11S366A. En la **Figura 13C** puede observarse como todos los mutantes de PSMD11 incorporan menos fósforo que la forma silvestre en relación a la cantidad de proteína.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

[illegible]

Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencia de PSMD11 con Clustal 2.0.5. Se usaron las secuencias de PSMD11 de humano (*homo sapiens*), de chimpancé (*Pan troglodytes*), de toro (*Bos taurus*), de ratón (*Mus musculus*), pez cebra (*Danio rerio*), de

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), del hongo unicelular *Dictiostelium discoideum* y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En amarillo se muestran los residuos de serina que están conservados solo en algunas secuencias, en verde los residuos de serina que están conservados en todas las secuencias. El asterisco (*) indica residuo conservado en todas las secuencias.

Por tanto, ninguno de los residuos de serina ensayados puede considerarse como diana dado que todos los mutantes sufren una pérdida considerable de fosforilación pero no total. Ello podría deberse a que al menos *in vitro*, AMPK sigue fosforilando a PSMD11, aunque la mutación de cada uno de los residuos de serina podría alterar la estructura de PSMD11 lo suficiente para que AMPK no pudiera fosforilar a los mutantes como lo hace con la forma silvestre.

3 Análisis de la fosforilación de PSMD11 por AMPK *in vivo*

Una vez visto que AMPK era capaz de fosforilar a PSMD11 *in vitro* procedimos a comprobar si, efectivamente esta fosforilación se daba también en un sistema *in vivo*. Para ello usamos células HEK293 transfectadas con la construcción myc-PSMD11 y analizamos los extractos crudos mediante electroforesis bidimensional. Como se observa en la **Figura 15**, en un extracto crudo procedente de células sin tratamiento, myc-PSMD11 se detecta como una única mancha mediante un anticuerpo específico anti-myc. Cuando las células han sido tratadas previamente a la obtención de extracto crudo durante 3 horas con AICAR 0,5 mM (un activador de AMPK), se observa que aparece una segunda mancha hacia el polo positivo. El desplazamiento de esta segunda mancha con respecto a la primera es aproximadamente 0,11 unidades de pH, lo cual es compatible con la adquisición de un solo grupo fosfato. Algo similar ocurrió cuando co-transfectábamos las células con una combinación de tres plásmidos (pCMV-myc-AMPK α 2T172D, pCMV-myc-AMPK β 2 y pCMV-myc-AMPK γ 1) que sobreexpresan una forma constitutivamente activa de AMPK (CA-AMPK). Además, cuando se usaba en vez de AICAR, un activador de AMPK más potente como es la fenformina a concentración de 5 mM, se observaba una

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

sola mancha, que tras el tratamiento con λ -fosfatasa, se desplazaba en su mayor parte hacia el polo negativo 0,11 unidades de pH, para situarse a la altura de la mancha mayoritaria de los extractos crudos sin tratar.

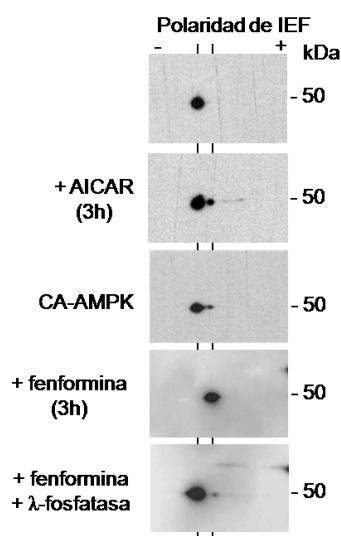


Figura 15. AMPK fosforila a PSMD11 *in vivo*. Extractos celulares de HEK293 transfectadas con pCMV-myc-PSMD11 se analizaron mediante 2D-electrophoresis y *western blotting* usando un anticuerpo monoclonal anti-myc (primera imagen). De manera similar se procedió con extractos celulares de HEK293 transfectadas con pCMV-myc-PSMD11 y tratadas con AICAR (0.5 mM, 3h) o con fenformina (5 mM, 3h) o co-transfectadas con una combinación de tres plásmidos (pCMV-myc-AMPK α 2T172D, pCMV-myc-AMPK β 2 y pCMV-myc-AMPK γ 1) que sobreexpresan una forma constitutivamente activa de AMPK (CA-AMPK). En el último panel se indica el resultado de muestras procedentes de cultivos tratados con fenformina (5 mM, 3h) y sometidas a λ -fosfatasa 30 minutos a 30 °C.

Todos estos resultados indican que la activación *in vivo* de AMPK modula el estado de fosforilación de PSMD11 introduciéndole un fosfato.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

4 Análisis del efecto de AMPK sobre la actividad proteolítica del proteasoma

Habiendo comprobado que AMPK es capaz de interaccionar y modificar el estado de fosforilación de PSMD11, subunidad que se ha descrito como importante en el funcionamiento del proteasoma (Glickman and Ciechanover, 2002; Sharon et al., 2006), decidimos comprobar si AMPK era capaz de modular la actividad proteasomal.

Para ello, ensayamos la acción de varios agentes químicos que modulan la actividad de AMPK, sobre la actividad proteasomal de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs; *mouse embryonic fibroblast*) de tipo silvestre y dobles mutantes que carecen de las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 (α 1 $^{-/-}$ y α 2 $^{-/-}$) cedidos por Dr. Benoit Viollet (Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), 75014 París, Francia y el INSERM U567, 75014 París, Francia).

Partimos de la hipótesis de que si el agente químico afectaba a la actividad del proteasoma a través de AMPK, los MEFs doble mutantes no responderían a él. Utilizando un reactivo comercial denominado Proteasoma-Glo (Promega) para medir la actividad del proteasoma *in vivo*, comprobamos si existían diferencias en la actividad del proteasoma entre los MEFs silvestres y dobles mutantes tras someterlos a diferentes agentes activadores de AMPK (Tabla 8).

Tabla 8. Agentes químicos y sus disolventes, usados sobre MEFs para determinar si AMPK ejerce algún tipo de regulación sobre el proteasoma. El asterisco (*) indica que se trata de productos químicos de origen natural (ver introducción).

AGENTE	DISOLVENTE
A769662	DMSO
AICAR	H2O
Berberina*	DMSO
EGCG*	H2O
Fenformina	H2O
Genisteina*	DMSO
Metformina	H2O
Resveratrol*	DMSO

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

4.1 Efecto mediado por AMPK de AICAR y metformina sobre la actividad del proteasoma en MEFs.

En primer lugar, tratamos ambas líneas de MEFs con dos activadores de AMPK ampliamente utilizados, AICAR y metformina, y también usamos como control positivo el inhibidor proteasomal, Lactacistina. Los MEFs se dejaron crecer 24h en DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, después se sustituyó el DMEM por medio mínimo KH con AICAR 0,5 mM o con metformina 2 mM o con Lactacistina 20 μ M. El medio KH, al ser bajo en nutrientes, induce un estado de ayuno que aumenta la actividad del proteasoma, por lo que permite observar mejor las posibles variaciones. Los tratamientos se mantuvieron durante 4h a 37 °C y se procedió a medir la actividad del proteasoma mediante Proteasoma-Glo (Promega). Como puede observarse en la **Figura 16**, tanto AICAR como Metformina, generan en los MEFs de tipo silvestre (wt) una reducción de la actividad del proteasoma del 20% aproximadamente, mientras que esta reducción no se da en los MEFs dobles mutantes para las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 (KO). Por otro lado, la Lactacistina inhibe la actividad del proteasoma casi por completo (97% aproximadamente) tanto en MEFs de tipo silvestre como en dobles mutantes.

Por lo tanto, cuando AMPK es activada en MEFs de tipo silvestre por AICAR o metformina, genera una inhibición de la actividad proteolítica del proteasoma en torno a un 20%. Esta inhibición no está presente en MEFs doble mutantes que no poseen una AMPK activa ya que carecen de las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

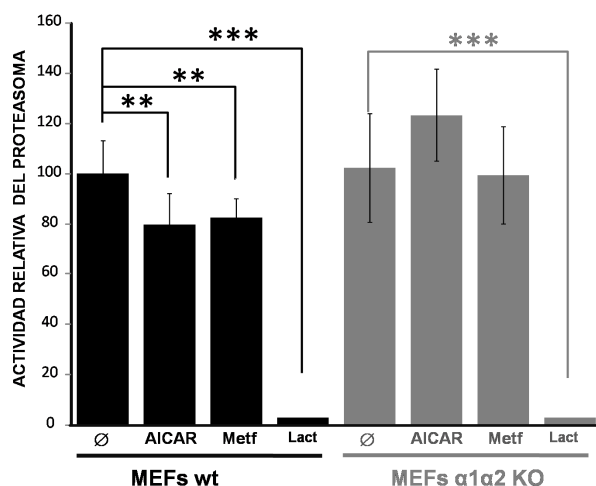


Figura 16. La activación de AMPK con AICAR y metformina reduce la actividad proteolítica del proteasoma. Se midió la actividad del proteasoma mediante Proteasoma-Glo (Promega) de MEFs de tipo silvestre y dobles mutantes que carecen de las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 (α 1 $^{-/-}$ y α 2 $^{-/-}$) incubados 4 horas a 37 °C en KH con AICAR 0,5 mM o con metformina 2 mM (Metf) o con Lactacistina 20 μ M (Lact) o sin adiciones (agua; Ø). Los valores son las medias de al menos seis experimentos independientes relativizadas a la actividad presente en MEFs de tipo silvestre sin tratar (Ø); y las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con **p <0,01 y ***p<0,001 (n: 6).

4.2 Efecto de otras sustancias activadoras de AMPK sobre la actividad del proteasoma en MEFs

Dado que AICAR y metformina afectan la actividad del proteasoma en MEFs mediante AMPK, decidimos estudiar el posible efecto regulador de AMPK sobre el proteasoma usando también otros agentes químicos activadores de AMPK descritos recientemente, como es el compuesto A-769662 o algunos compuestos químicos naturales derivados de plantas (berberina, genisteína, resveratrol, y EGCG) (Tabla 8).

Tomando como punto de partida la misma hipótesis y efectuando el mismo tipo de ensayo descrito en el punto anterior, empezamos por

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

comprobar, sobre los MEFs de tipo silvestre, si A-769662, berberina, genisteína, resveratrol, y EGCG generaban inhibición de la actividad proteasomal. Incubamos los MEFs de tipo silvestre durante 1h con cada fármaco a concentraciones de 10 μ M y 100 μ M en medio KH y medimos la actividad del proteasoma. Como puede observarse en la **Figura 17**, la actividad del proteasoma en MEFs de tipo silvestre se ve reducida por A-769662, genisteína y resveratrol, pero no por EGCG o berberina.

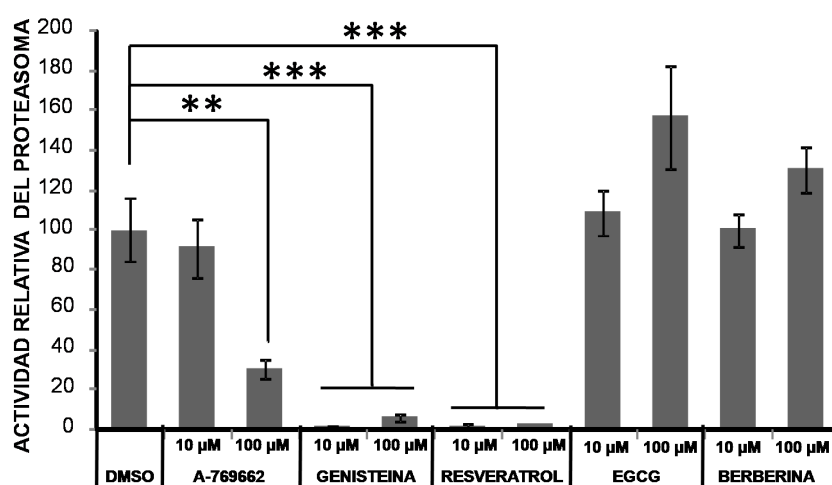


Figura 17. Actividad proteolítica del proteasoma de MEFs de tipo silvestre en presencia de diferentes fármacos a concentraciones de 10 μ M y 100 μ M en KH. Se midió la actividad del proteasoma mediante Proteasoma-Glo (Promega) tras incubación de 1 hora a 37 °C. Los valores son las medias de al menos cuatro experimentos independientes relativizadas a la actividad presente en MEFs control (DMSO) y las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (n: 4).

A continuación comprobamos si estos fármacos tenían algún tipo de efecto sobre la actividad proteasomal en MEFs doble mutantes carentes de AMPK α 1 y AMPK α 2. Esto nos permitiría comprobar, si al igual que ocurría con AICAR y metformina, su efecto sobre el proteasoma está mediado por AMPK. Dado que ni EGCG ni berberina presentaron efecto inhibitorio sobre la actividad del proteasoma fueron descartados para el estudio. Como se

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

observa en la Figura 18, tanto A-769662, genisteína como el resveratrol, inhiben la actividad proteolítica del proteasoma de MEFs doble mutantes de AMPK α de manera similar a como lo hacían sobre los MEFs de tipo silvestre.

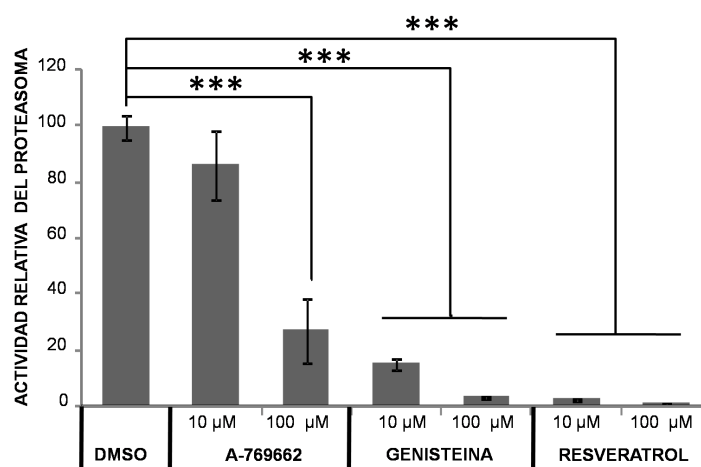


Figura 18. Actividad proteolítica del proteasoma de MEFs dobles mutantes de AMPK α 1 y AMPK α 2 en presencia de diferentes fármacos a concentraciones de 10 μ M y 100 μ M en KH. Se midió la actividad del proteasoma mediante Proteasoma-Glo (Promega) tras incubación de 1 hora a 37 °C. Los valores son las medias de al menos cuatro experimentos independientes relativizadas a la actividad presente en MEFs control (DMSO) y las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con *** p <0,001 (n: 4).

Así pues, estos datos nos indican que la actividad inhibidora del proteasoma que presentan A-769662, genisteína y el resveratrol no es dependiente de AMPK.

1) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

5 Acción de A-769662 sobre la actividad proteolítica del proteasoma

El fármaco A-769662 había sido descrito como el activador de AMPK más específico y potente hasta el momento (Cool et al., 2006; Goransson et al., 2007; Sanders et al., 2007a). En nuestros ensayos de actividad del proteasoma habíamos observado que A-769662 producía inhibición de la proteólisis mediada por proteasoma. Esto lo hacía de manera independiente de AMPK, puesto que en MEFs dobles mutantes que carecen de las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 el efecto era similar al obtenido en MEFs de tipo silvestre. Por todo ello, y dado que este efecto no había sido descrito con anterioridad, decidimos estudiar con más profundidad la acción de A-769662 sobre la actividad del proteasoma.

En primer lugar comprobamos mediante SDS-PAGE y revelado con anticuerpos anti conjugados de ubiquitina, que en MEFs de tipo silvestre (tratados entre 1 hora y 24 horas con KH con A-769662 a 300 μ M o con DMSO) se acumulaban proteínas poliubiquitinadas como resultado de la inhibición de la actividad proteasomal. El control de inhibición se efectuó con lactacistina 10 μ M durante 1 hora (Figura 19 A). En estas mismas condiciones, analizamos si este cambio de actividad del proteasoma en presencia A-769662 era efecto de la inhibición de transcripción o traducción de subunidades proteasomales. Para ello, analizamos mediante SDS-PAGE la expresión de dos subunidades características del proteasoma: Rpn2/S1 de la partícula reguladora 19S y β 2 del núcleo catalítico 20S (Figura 19 B).

Estos resultados indican que el efecto inhibitorio de A-769662 sobre la actividad proteolítica del proteasoma se mantiene, como mínimo 24 horas en MEFS. Esta bajada de actividad no parece ser debida a que A-769662 este afectando a los procesos de transcripción génica o traducción de subunidades del proteasoma ya que al menos dos subunidades canónicas de éste no presentan variaciones de expresión en presencia de A-769662 durante 24 horas.

Adicionalmente, estudiamos si el efecto inhibitorio de A-769662 sobre el proteasoma se confirmaba en un ensayo experimental alternativo, con otra línea celular, HEK293-GFPu-1. Esta línea expresa de manera estable una fusión entre la proteína verde fluorescente (GFP; *green fluorescent protein*) y una señal específica de degradación proteasomal (degron CL1) (Bence et

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

al., 2001). Esta fusión es muy inestable y es degradada rápidamente por el proteasoma. Si la función proteolítica del proteasoma es disminuida, se produce una acumulación de GFPu-1 y por tanto un incremento de la fluorescencia de las células. Para ensayarlo, crecimos HEK293-GFPu-1 en DMEM durante 24 horas y después, incubamos 1 hora a 37 °C en KH que contenía lactacistina 10 µM o A-769662 a dos concentraciones 50 y 300 µM, el control se efectuó con DMSO. A continuación, la fluorescencia de cada cultivo se midió mediante espectrometría de flujo. En la **Figura 19 C** se puede ver como en HEK293-GFPu-1 se da un aumento de la fluorescencia en presencia de lactacistina o de A-769662 de manera dependiente de la concentración respecto del control con DMSO, lo que indica una bajada de la actividad proteolítica del proteasoma.

Ello, indica que en otra línea celular diferente de los MEFs, como HEK293-GFPu-1, se reproduce el efecto inhibitorio de A-769662 sobre la actividad del proteasoma

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

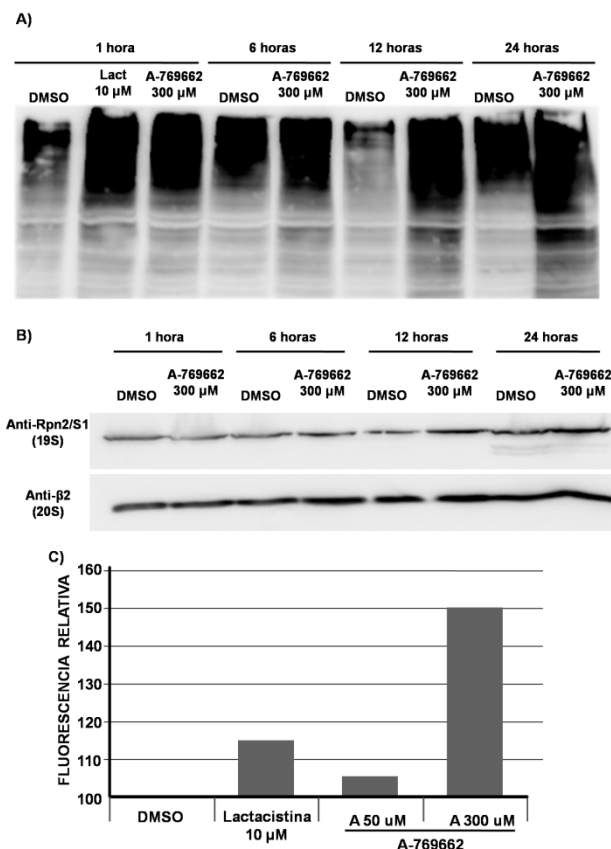


Figura 19. Confirmación del efecto inhibitorio de A-769662 sobre la actividad del proteasoma. **A)** MEFs de tipo silvestre cultivados 24 horas en DMEM, fueron tratados entre 1 y 24 horas en KH con A-769662 a 300 μ M o con DMSO; el control se efectuó con lactacistina 10 μ M (lact) durante 1 hora. Después, sesenta microgramos de proteína total de extracto crudo fueron sometidos a SDS-PAGE y revelados con anti-conjugados de ubiquitina. **B)** En las mismas condiciones de A, se analizó por SDS-PAGE y revelado anti-S1 y anti- β 2 la expresión de dos subunidades del proteasoma Rpn2/S1 (19S) y β 2 (20S). **C)** HEK293-GFPu-1 fueron cultivadas en DMEM durante 24 horas y después incubamos 1 hora a 37 $^{\circ}$ C en KH que contenía lactacistina 10 μ M o A-769662 a dos concentraciones 50 y 300 μ M, el control se efectuó con DMSO. La fluorescencia de cada cultivo se midió mediante espectrometría de flujo y se relativizó a la presente en el control con DMSO.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

5.1 Determinación de IC₅₀ de A-769662 sobre la actividad proteolítica del proteasoma *in vivo*.

Con el propósito de determinar el alcance de la inhibición del proteasoma por A-769662, realizamos ensayos similares a los descritos anteriormente con un rango más amplio de concentraciones de A-769662 en KH, incubando ambos tipos de MEFs durante 1 hora a 37 °C. De esta forma determinamos el IC₅₀ (la concentración de producto a la cual la actividad proteolítica del proteasoma disminuye un 50%) para poder compararlo con el de otros fármacos inhibidores del proteasoma. Como se observa en la Figura 20 A, la respuesta a cada una de las diferentes concentraciones de A-769662 de los MEFs silvestres (WT) y dobles mutantes (KO) fue similar. Además, como se observa en la Figura 20 B, el IC₅₀ de A-769662 para ambas líneas es muy parecida: siendo de 47 μ M para los MEFs doble mutantes y de 62 μ M para los MEFs silvestres.

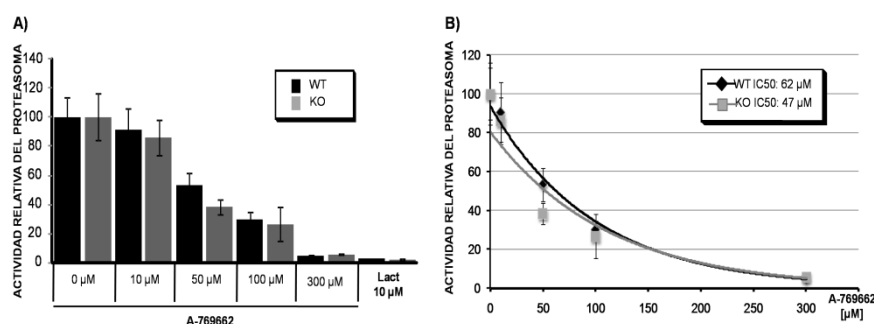


Figura 20. Determinación de la IC₅₀ de inhibición de A-769662 sobre el proteasoma. A) Actividad proteolítica del proteasoma de MEFs de tipo silvestre (WT) y dobles mutantes de AMPK α 1 y AMPK α 2 (KO) en presencia lactacistina (lact) 10 μ M o de concentraciones de entre 0 (DMSO) y 300 μ M A-769662 en KH, incubados 1 hora a 37 °C. Se midió la actividad del proteasoma mediante Proteasoma-Glo (Promega). B) Gráfica de las medias de actividad del proteasoma ajustadas por regresión exponencial para interpolar el valor de IC₅₀ de la concentración de A-769662 en ambas líneas celulares. Los valores son las medias de al menos cuatro experimentos independientes relativizadas a la actividad presente en MEFs silvestres en 0 μ M de A-769662 (DMSO); las barras indican la desviación estándar (n: 4).

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

De esta manera, el efecto de A-769662 sobre la actividad del proteasoma es de al menos un orden de magnitud menor que el de un inhibidor proteasomal muy potente, como la lactacistina, cuya IC50 está en rango nanomolar.

5.2 El efecto de A-769662 sobre la actividad proteasomal es reversible

En todos los experimentos en los que hemos comprobado el efecto de A-769662, hemos cultivado las células en DMEM durante 24h y después hemos cultivado las células en medio mínimo KH para incrementar la degradación de proteínas por incremento de actividad proteasomal. Para comprobar si el efecto inhibitorio de A-769662 sobre la actividad del proteasoma era previo a la activación proteasoma o si seguía teniendo efecto incluso en proteasomas previamente activados, llevamos a cabo una variación en el protocolo experimental. Cultivamos los MEFs 24 horas en DMEM, cambiamos el medio por KH sin fármaco durante 1h A 37° C y después tratamos las células durante 1 hora más con DMSO o A-769662 a concentración 50 μ M. Observamos que A-769662 era capaz de reducir la actividad proteasomal que había sido incrementada por el medio KH previamente (**Figura 21 A**). Comprobamos asimismo, que la actividad de A-769662 sobre la actividad del proteasoma era reversible. Para ello adicionamos durante 1 hora KH con DMSO o A-769662 a concentración 50 μ M y después lo sustituimos por KH solo. Como se observa en la **Figura 21 B**, tras retirar A-769662, la actividad del proteasoma se recupera.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

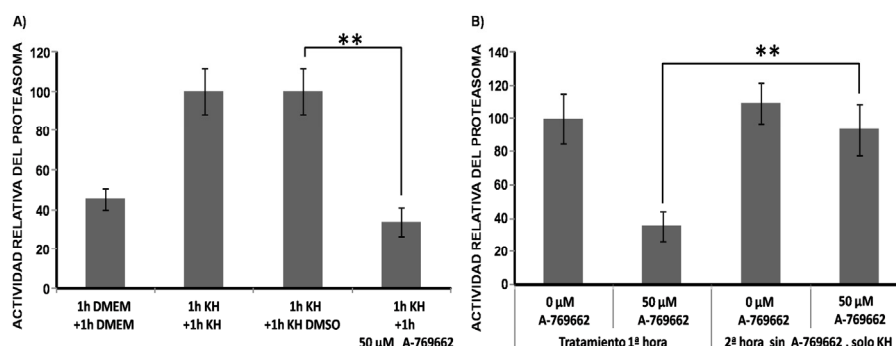


Figura 21. El efecto de A-769662 sobre la actividad proteasomal es independiente del estado de activación del proteasoma y, además, reversible. **A)** MEFs de tipo silvestre cultivados 24 horas en DMEM; después, 1 hora en KH a 37° C. A continuación tratamos las células durante 1 hora más con DMSO o A-769662 a concentración 50 μM. **B)** MEFs de tipo silvestre cultivados 24 horas en DMEM, a continuación tratamos las células durante 1 hora a 37° C en KH con DMSO o A-769662 a concentración 50 μM y después reemplazamos el tratamiento por KH sin A-769662 durante 1 hora más a 37° C. Tanto en (A) como en (B) se midió la actividad *in vivo* del proteasoma mediante Proteasoma-Glo (Promega). En ambos casos la actividad esta relativizada a las incubaciones de 1 hora en KH sin A-769662 (con DMSO); las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con $^{**}p < 0,01$ (n: 4).

Por tanto, la actividad de A-769662 sobre el proteasoma se da con independencia del estado de activación de este último, ya que en MEFs cuyos proteasomas se encuentran activados previamente por un medio mínimo (KH), A-769662 sigue teniendo el mismo efecto. Ello sugiere que tiene un efecto directo sobre el proteasoma. Además, el efecto de A-769662 es reversible, dado que una vez retirado el fármaco del medio de incubación, los MEFs recuperan una actividad proteasomal similar al control.

5.3 Determinación del nivel de actuación de A-769662 sobre el proteasoma

El proteasoma está compuesto mayoritariamente de un núcleo catalítico 20S (que presenta las actividades de tipo proteasa) y de una o

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

dos partículas reguladoras 19S, que mediante actividad ATPasa y deubiquitinasa de alguna de las subunidades que la componen, median el desplegamiento y el paso del sustrato al núcleo. Con el propósito de determinar si A-769662 inhibe al proteasoma afectando a la partícula 19S o impidiendo las actividades proteasa del núcleo 20S, usamos proteasomas purificados comerciales 20S y 26S (20S + 19S). Con ellos llevamos a cabo ensayos *in vitro* de actividad en presencia y ausencia de varias concentraciones de A-769662 usando como control epoxomicina a 0,5 μ M, que es un inhibidor proteasomal que actúa a nivel del núcleo 20S. Como puede observarse, A-769662 es capaz de inhibir la actividad del proteasoma 26S (Figura 22 A) pero no la del proteasoma 20S (Figura 22 B).

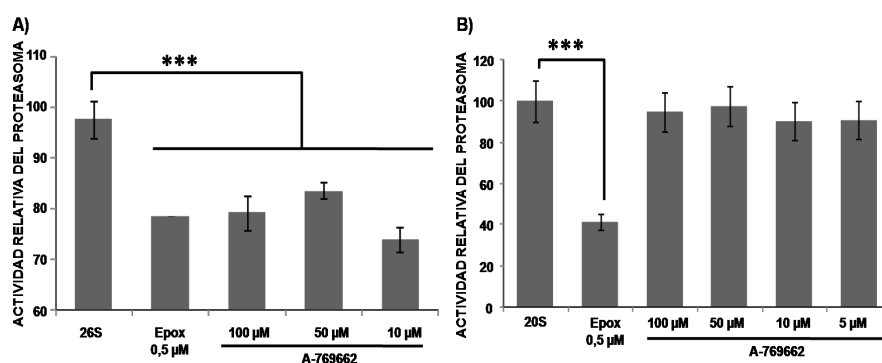


Figura 22. A-769662 afecta la actividad *in vitro* de proteasomas purificados 26S pero no la actividad de proteasomas purificados 20S. Preparaciones comerciales (Biomol) de proteasoma 26S (A) y de proteasoma 20S (B) fueron incubados o no con epoxomicina 0,5 μ M (Epo) o con las concentraciones indicadas de A-769662. Tras efectuar los ensayos de acuerdo con las instrucciones del proveedor, medimos la fluorescencia en un lector de placas multipocillo. En ambos casos la actividad esta relativizada a la presente en el control sin inhibidores. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con *** $p < 0,001$ (n: 4).

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

Para determinar si el efecto de A-769662 sobre la actividad del proteasoma estaba mediado por la disrupción de la interacción entre la partícula reguladora 19S y el núcleo 20S, realizamos un ensayo peptidasa en gel con proteasomas 20S y 26S. El ensayo consistió en incubar los proteasomas 20S y proteasomas 26S con DMSO o A-769662 100 μ M durante 30 minutos a 37° C. Después la integridad de los proteasomas se determinó en una electroforesis nativa en un gel del 4% de acrilamida y a continuación el gel fue incubado 30 minutos a 30° C en tampón de revelado, que contenía el péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC a 100 μ M. Como se observa en la tinción coomasie de la **Figura 23**, el proteasoma 26S aparece en varias formas; una de migración lenta, mayoritaria, que contiene dos partículas reguladoras 19S y un núcleo catalítico 20S, y otra de migración rápida, también mayoritaria, que contiene una partícula 19S y un núcleo 20S. También se observan formas de migración más rápida, muy minoritarias, que corresponden a núcleos 20S, ya que migran a la altura del control de proteasoma 20S con DMSO. En la imagen de fluorescencia de la **Figura 23**, se puede ver que A-769662 no afecta a la integridad del proteasoma 26S ya que exhibe el mismo patrón de actividad peptidasa en gel que el control con DMSO, presentando mayoritariamente proteasomas 26S con una o dos partículas 19S.

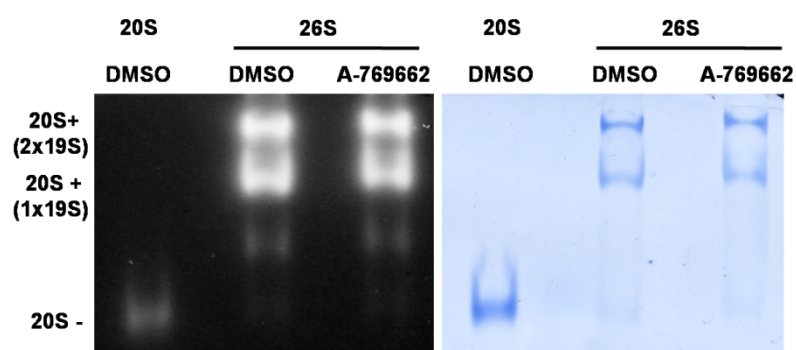


Figura 23. Ensayo peptidasa en gel de proteasomas 20S y 26S. 3 μ g de proteasomas fueron incubados con DMSO o A-769662 100 μ M durante 30 minutos a 37 °C. Después fueron analizados mediante electroforesis nativa en un gel del 4% de acrilamida. A continuación el gel fue incubado 30 minutos a 30° C en tampón de revelado con péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC a 100 μ M. La fluorescencia

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

derivada de la proteólisis del péptido fluorogénico dentro del gel fue visualizada mediante transilumador ultravioleta y cámara fotográfica (foto izquierda). Después, el gel fue teñido con azul coomassie (foto derecha).

En resumen, estos datos indican que A-769662 inhibe el proteasoma afectando la actividad de la partícula reguladora 19S, y no a las actividades proteolíticas del núcleo catalítico 20S. Además, como se observa en el ensayo peptidasa en gel, su acción no está mediada por la disrupción del proteasoma 26S. Indicativo de ello es que la fluorescencia de proteasomas 26S tratados con A-769662 tiene el mismo patrón que el control 26S tratado con DMSO.

5.4 Toxicidad y efectos de A-769662 sobre el ciclo celular

Ha sido descrito que la inhibición del proteasoma tiene como resultado efectos sobre ciclo celular y la entrada en apoptosis. Con objetivo de determinar si A-769662 afectaba de alguna manera a la viabilidad y la proliferación celular, tratamos MEFs con A-769662 y determinamos sus efectos sobre el ciclo y la viabilidad celular. En primer lugar analizamos mediante microscopia cultivos de MEFs de tipo silvestre y dobles mutantes para AMPK α tratados con DMSO o A-769662 a 300 μ M en KH durante 24 horas. A las 12 horas de tratamiento con A-769662, ambos tipos de MEFs comenzaban a redondearse y a despegarse de la placa. A las 24 horas, el cultivo se encontraba redondeado y despegado en un elevado porcentaje (Figura 24 A). Este aparente efecto tóxico de A-769662 sobre los MEFs fue corroborado mediante análisis de viabilidad celular por citometría de flujo. Para ello, se efectuó un ensayo similar al anterior y se recogieron MEFs a las 24 horas mediante tripsinización y se colectaron junto con sus sobrenadantes por centrifugación. A continuación, las células fueron resuspendidas en PBS IX con 0,5 mg/mL de RNAsa y 50 μ g/mL de yoduro de propidio e incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente 30 minutos. Las células muertas por necrosis tienen la membrana perforada y mantienen el ADN sin segmentar, con lo que mediante este proceso incorporan yoduro de propidio, mientras que las células vivas no. La viabilidad se determinó por citometría de flujo como el porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio respecto del total. Tras 24 horas en KH con A-769662 a 300 μ M el 24% del cultivo de MEFs de tipo silvestre no era viable, mientras que tras 24

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

horas en KH con DMSO solo el 6,3% del cultivo no era viable (Figura 24 B). Con MEFs dobles mutantes se obtuvieron resultados similares.

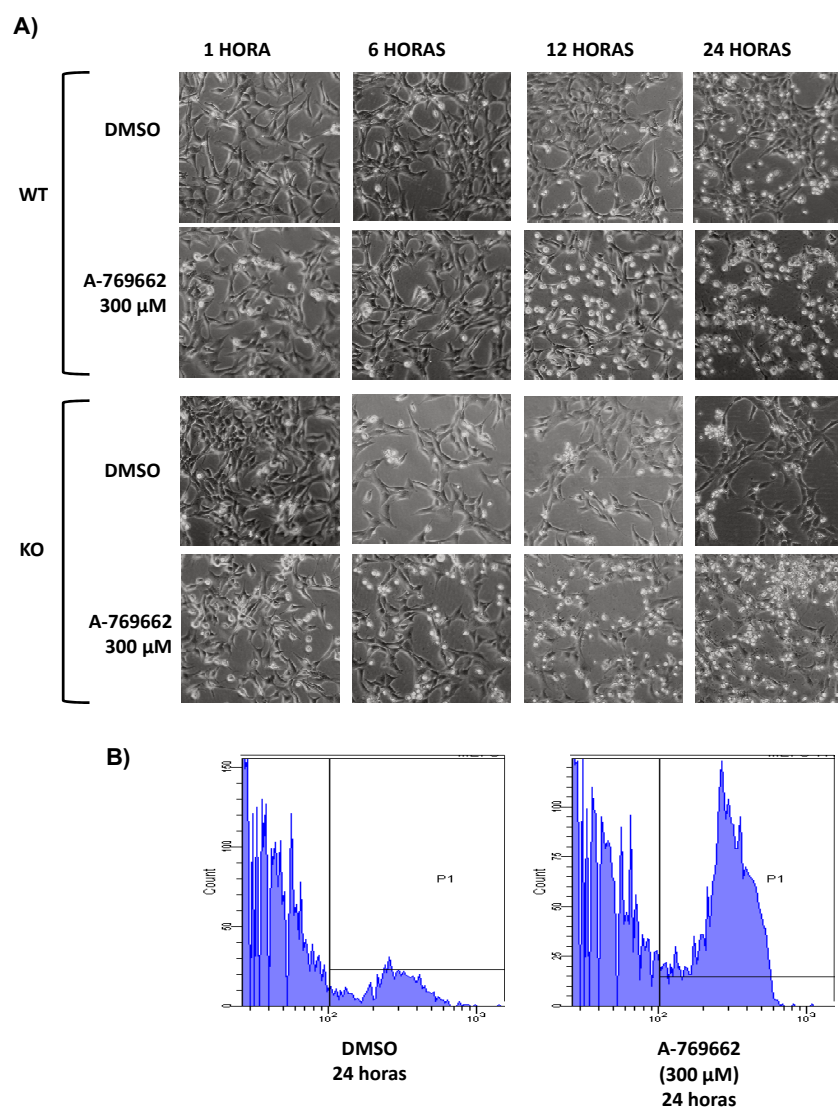


Figura 24. A-769662 tiene efectos tóxicos sobre MEFs. A) Fotografías de microscopio invertido (20X) de cultivos de MEFs de tipo silvestre y dobles mutantes de AMPK α 1 y AMPK α 2 incubados a los tiempos indicados en KH con A-769662 a 300 μ M o DMSO como control. B) Determinación de la viabilidad celular

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

mediante yoduro de propidio y citometría de flujo de cultivos de MEFs de tipo silvestre incubados 24 horas en KH con A-769662 a 300 μ M o DMSO como control.

Además, se realizó el análisis del ciclo celular de MEFs de tipo silvestre mediante citometría de flujo. La proporción celular en cada fase del ciclo celular (G1, S y G2) se determinó analizando los datos de citometría con el programa MODFIT. En aquellos MEFs incubados en KH con DMSO se da un incremento de la cantidad de células en fase G1 a partir de las 6 horas hasta las 24 horas, mientras que aquellos MEFs de tipo silvestre incubados en KH con A-769662 a 300 μ M no presentaban incremento de la cantidad de células ni en G1 ni en G2 ni en S a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 25).

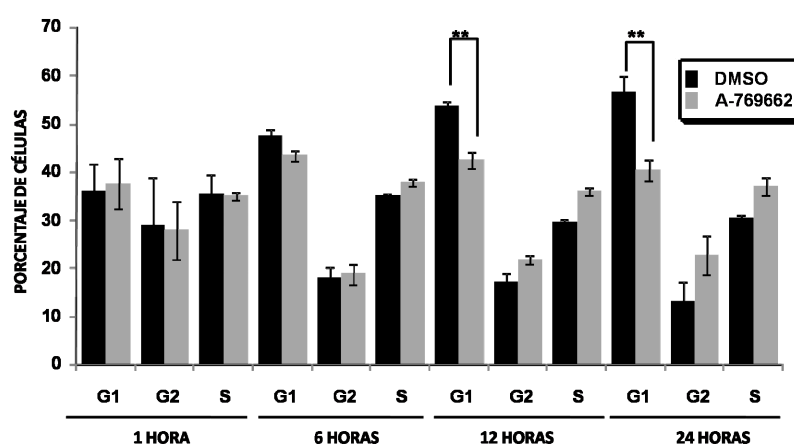


Figura 25. A-769662 afecta al ciclo celular. Porcentaje de células de MEFs de tipo silvestre en cada fase del ciclo celular a 1, 6, 12, y 24 horas de tratamiento con DMSO (negro) o A-769662 a 300 μ M (gris) en KH. El análisis del ciclo celular se realizó por citometría de flujo. La proporción celular en cada fase del ciclo celular (G1, S y G2) se determinó analizando los datos de citometría con el programa MODFIT. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con $**p < 0,05$.

I) Efecto de AMPK sobre PROTEASOMA

Aunque previamente ya se había mostrado que A-769662 no tenía efecto tóxico medible en hepatocitos (Cool et al., 2006), estos resultados indican que A-769662 tiene efecto tóxico al menos sobre MEFs a las concentraciones ensayadas. Además, la incubación de MEFs con A-769662 causa arresto del ciclo celular, que es consistente con su acción inhibitoria sobre la actividad del proteasoma, dado que la actividad de éste es necesaria para la progresión en los sucesivos pasos del ciclo celular.

II) Efecto del UPS sobre AMPK

II) Efecto de UPS sobre AMPK

Ya se había indicado que AMPK podría sufrir degradación dependiente de proteasoma, dado que las tres subunidades de AMPK libres, sin interaccionar entre ellas, tienen un tiempo de vida media inferior al que presentan cuando forman parte del complejo trimérico AMPK (Crute et al., 1998). También se había observado que en ciertas condiciones AMPK se ubiquitina (Al-Hakim et al., 2008). Dada la poca información existente hasta el momento en referencia al efecto regulador que el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS; *ubiquitin proteasome system*) puede tener sobre AMPK, nos propusimos estudiar si este efecto existía. Además, dado que nuestro laboratorio ha definido recientemente una relación funcional entre AMPK y un complejo formado por laforina (una fosfatasa de tipo dual) y malina (una E3 ubiquitina ligasa) (Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009), también nos propusimos analizar si este complejo es capaz de modificar AMPK.

1 AMPK se ubiquitina

Con la intención de comprobar si efectivamente AMPK se modificaba por ubiquitinación, pusimos a punto un ensayo para el análisis de proteínas ubiquitinadas basado en la expresión de una versión de ubiquitina marcada con 6 residuos de histidina (6xHis-UB) en células de mamífero HEK293 (Kaiser et al., 2005). Para este ensayo se transfectaron células HEK293 con el plásmido 6xHis-UB en combinación con un plásmido pCMV-myc-AMPK que expresaba AMPK α 2, AMPK β 2, o AMPK γ 1. A las 18 horas de la transfección, las células se trataron o no con el inhibidor proteasomal MG132 a concentración 50 μ M durante 16 horas. A continuación se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M, un potente agente caotrópico que evita la acción de las deubiquitininas. Las proteínas ubiquitinadas conteniendo la fusión 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelado con anticuerpos específicos anti-myc. Como se ve en la **Figura 26 A**, la inhibición del proteasoma con MG132 genera acumulación de formas poliubiquitinadas de las tres subunidades de AMPK utilizadas: AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1. También estudiamos si las subunidades de AMPK que forman parte del complejo trimérico endógeno se modificaban por ubiquitinación. Para ello se transfectaron células HEK293 solo con el

II) Efecto de UPS sobre AMPK

plásmido 6xHis-UB. A las 18 horas de la transfección, las células se trataron o no con el inhibidor proteasomal MG132 a concentración 50 μ M durante 16 horas y fueron analizadas igual que se describe arriba. Como se ve en la Figura 26 B, la inhibición del proteasoma con MG132 genera únicamente la ubiquitinación de la subunidad AMPK β endógena.

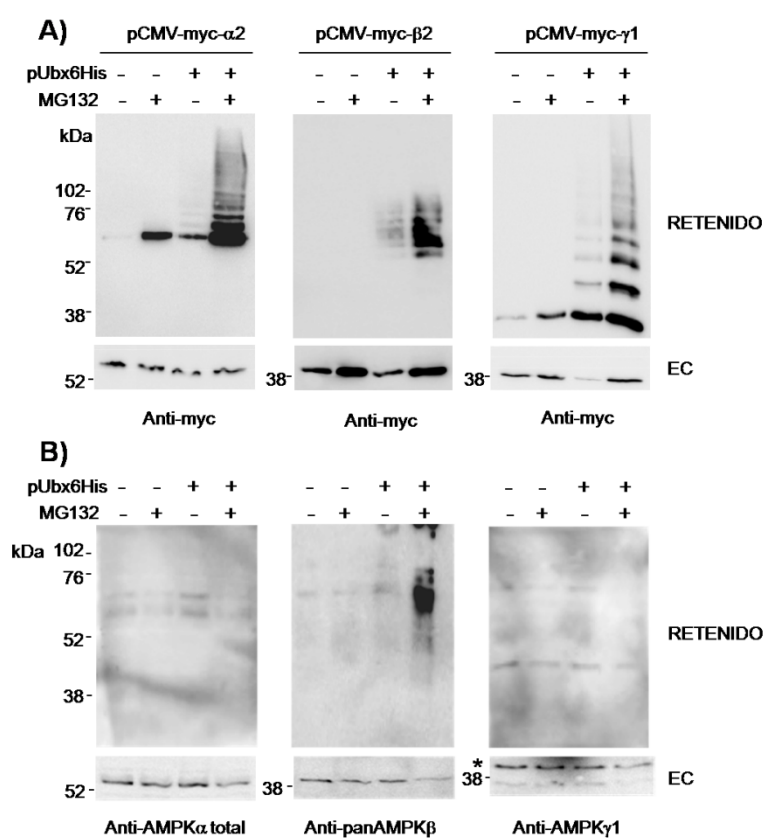


Figura 26. La parada del proteasoma con MG132 induce la acumulación de formas poliubiquitinadas de subunidades de AMPK. A) Se transfectaron células HEK293 con el plásmido 6xHis-UB en combinación con un plásmido pCMV-myc-AMPK α 2, AMPK β 2, o AMPK γ 1. A las 18 horas de la transfección, las células se trataron o no con el inhibidor proteasomal MG132 a concentración 50 μ M durante 16 horas. A continuación se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por

II) Efecto de UPS sobre AMPK

cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos anti-myc. B) Se transfectaron células HEK293 solo con el plásmido 6xHis-UB y fueron analizadas como en (A) usando los anticuerpos indicados (* banda inespecífica). RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 µg del extracto crudo.

Estos datos indican, que por un lado, estas subunidades de AMPK pueden ser ubiquitinadas, aunque cuando AMPK α y AMPK γ forman parte del complejo trimérico son menos susceptibles de ser ubiquitinadas. Por el otro, indican que la degradación de estas proteínas esta mediada por el UPS, ya que un inhibidor del proteasoma como el MG132 produce su acumulación.

2 El complejo laforina-malina promueve la ubiquitinación de las subunidades de AMPK libres

En el sistema UPS, la transferencia de ubiquitina a proteínas diana, es una reacción de tres pasos que catalizan tres enzimas (E1, E2 y E3). El último de los pasos, la unión de ubiquitina al sustrato, es realizado por E3 ubiquitina ligasas. Por esto, buscamos posibles E3 ubiquitina ligasas susceptibles de afectar a AMPK. En nuestro laboratorio, recientemente se ha descrito que AMPK regula la actividad del complejo laforina-malina, mediante interacción directa entre AMPK y laforina (Solaz-Fuster et al., 2008). Laforina es una fosfatasa dual y malina es una E3 ubiquitina ligasa de tipo RING. Así, decidimos comprobar si el complejo laforina-malina participaba en la ubiquitinación de AMPK. Para este ensayo, en células HEK293, se sobreexpresaron 6xHis-UB y las subunidades de AMPK (pCMV-myc-AMPK α 2, AMPK β 2 o AMPK γ 1) en combinación con laforina (pCMV-HA-laforina), malina (pCDNA-HA-malina), o ambas. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M y se procedió de forma similar al punto anterior. Como observamos en la **Figura 27**, la sobreexpresión de laforina y malina al mismo tiempo promueve la poliubiquitinación de las tres subunidades de AMPK utilizadas: AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1. Sin embargo, la sobreexpresión de laforina y malina

II) Efecto de UPS sobre AMPK

por separado solo produce una poliubiquitinación residual en comparación a cuando actúan juntas.

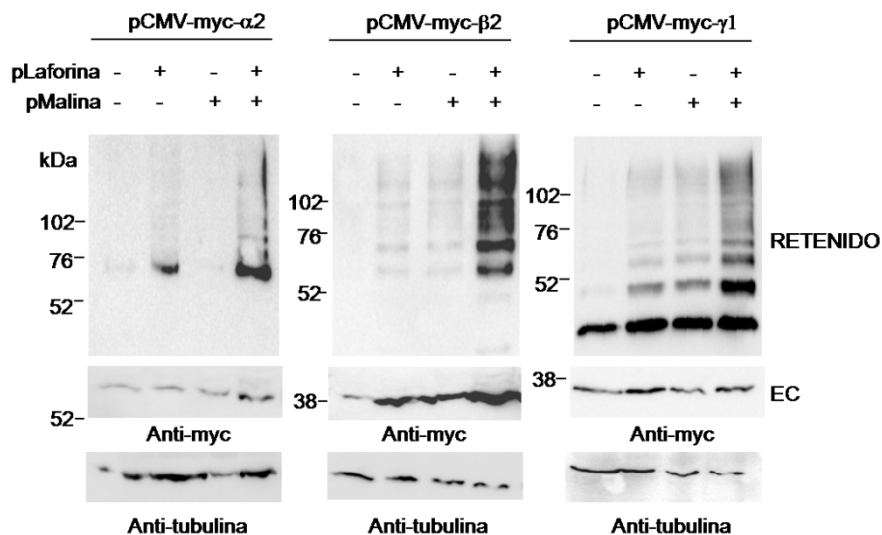


Figura 27. La sobreexpresión de la ubiquitina ligasa malina junto con la fosfatasa laforina induce la acumulación de formas poliubiquitinadas de subunidades de AMPK. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y las subunidades de AMPK (pCMV-myc-AMPK α 2, AMPK β 2 o AMPK γ 1) en combinación con laforina (pCMV-HA-laforina), malina (pCDNA-HA-malina), o ambas. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos anti-myc. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Para confirmar que la poliubiquitinación observada no es efecto inespecífico de la sobreexpresión de E3 ubiquitina ligasas en general, llevamos a cabo el mismo experimento pero sobreexpresando otra E3 ubiquitina ligasa de tipo RING. Usamos Mdm2, que está relacionada con la poliubiquitinación de p53 (Brooks and Wei, 2004). Como se observa en la

II) Efecto de UPS sobre AMPK

Figura 28, Mdm2 no poliubicitina ninguna de las subunidades de AMPK en el grado en el que lo hace el complejo laforina-malina, mientras que Mdm2 sí que es muy activa sobre su sustrato p53.

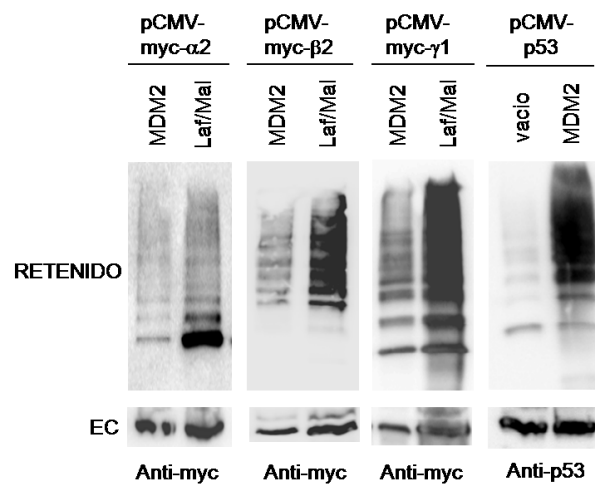


Figura 28. La acción del complejo laforina-malina sobre AMPK es específica. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y las subunidades de AMPK (pCMV-myc-AMPK α 2, AMPK β 2 o AMPK γ 1) en combinación con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina, o con pCDNA-Mdm2. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Todos estos datos confirman, por un lado, la observación previa de nuestro laboratorio de que malina necesita de laforina para formar un complejo funcional. Por otro indican, que el complejo laforina-malina promueve la modificación por ubiquitinación de las tres subunidades de AMPK libres ensayadas. Además, la baja actividad de malina en ausencia de laforina indica que la poliubiquitinación observada no es mero efecto inespecífico de la sobreexpresión de E3 ubiquitina ligasas. Esto último queda confirmado al sobreexpresar en el mismo sistema una E3 ubiquitina ligasa no

II) Efecto de UPS sobre AMPK

relacionada con AMPK como es Mdm2, que sí actúa sobre su sustrato p53 pero no sobre las subunidades de AMPK ensayadas.

3 Mapeo de la ubiquitinación de AMPK por laforina-malina

A fin de conocer si la acción del complejo laforina-malina era general sobre otras subunidades de AMPK hicimos extensivo el análisis a AMPK α 1 y AMPK β 1. Para ello ejecutamos un ensayo similar pero transfectando con construcciones que contenían las isoformas de rata: pCMV-myc-AMPK α 1 y pCMV-myc-AMPK β 1. En la **Figura 29** se observa que el complejo laforina-malina también poliubiquitina estas isoformas.

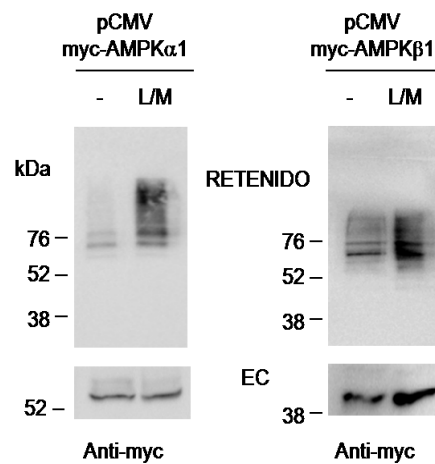


Figura 29. Otras isoformas de subunidades de AMPK también son modificadas por el complejo laforina-malina. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y las isoformas AMPK α 1 y AMPK β 1 de rata (pCMV-myc-AMPK α 1 y pCMV-myc-AMPK β 1) en combinación con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos anti-myc. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

A continuación nos dispusimos a mapear las regiones de AMPK α 2 y AMPK β 2 relacionadas con la ubiquitinación dependiente del complejo laforina-malina. Comenzamos construyendo dos formas truncadas de AMPK α 2, clonándolas en el plásmido pCMV-myc. Una contenía el fragmento N-terminal (residuos 1-312), en el cual se halla el dominio catalítico (KD) (pCMV-myc-KD) y la otra forma contenía el fragmento C-terminal (residuos 313-552) que alberga el dominio regulador (RD) involucrado en la unión a las subunidades AMPK β y AMPK γ (pCMV-myc-RD) (**Figura 30 A**). Mediante el mismo sistema de análisis de ubiquitinación pudimos comprobar que ninguna de las formas truncadas de AMPK α 2 son modificadas por el complejo laforina-malina (**Figura 30 A**). De manera similar, construimos formas truncadas de AMPK β 2. Una contenía el fragmento N-terminal (residuos 1-185), el cual presenta el dominio de unión a glucógeno (GBD) (pCMV-myc-GBD), y la otra forma contenía el fragmento C-terminal (residuos 186-271) que alberga el dominio de asociación a AMPK α y AMPK γ (ASC) involucrado en la unión a estas subunidades (pCMV-myc-ASC). Como se observa en la **Figura 30 B**, ambos fragmentos truncados no parecen ser modificados eficientemente por acción del complejo laforina-malina.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

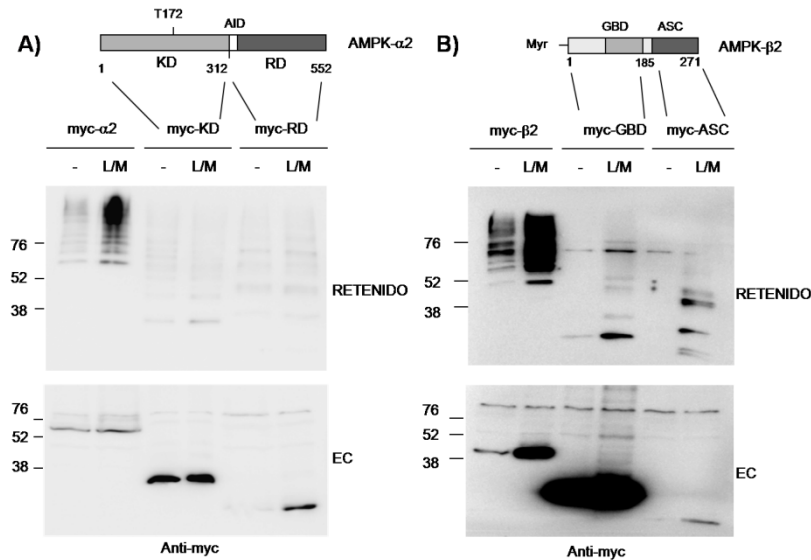


Figura 30. Mapeo de la ubiquitinación de AMPK por el complejo laforina-malina. **A)** En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y pCMV-myc-AMPK α 2, o su dominio catalítico N-terminal (residuos 1-312) (pCMV-myc-KD) o su dominio regulador C-terminal (residuos 313-552) (pCMV-myc-RD) en combinación con o sin pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos anti-myc. **B)** del mismo modo en (A) se usaron pCMV-myc-AMPK β 2, su dominio N-terminal (residuos 1-185) que contiene el dominio de unión a glucógeno (pCMV-myc-GBD) y su fragmento C-terminal (residuos 186-271) que alberga el dominio de asociación a AMPK α y AMPK γ (pCMV-myc-ASC). RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Estos datos sugieren que, en el caso de AMPK α 2, tanto el dominio quinasa (KD) como el dominio regulador (RD) son necesarios para que el complejo laforina-malina actúe sobre AMPK α 2 ubiquitinándola. De forma similar, parece que es necesaria la forma completa de AMPK β 2 para generar un motivo que sea ubiquitinado de manera eficiente por el complejo laforina-malina.

4 La fosforilación de la treonina 172 de AMPK α 2 afecta la ubiquitinación por laforina-malina

Los resultados anteriores indican que AMPK α 2 necesita tanto el dominio quinasa como el dominio regulador para que el complejo laforina-malina actúe sobre ella ubiquitinándola. Ello coincide con datos publicados recientemente, que indican que otras quinasas de la misma familia que AMPK sufren ubiquitinación en la región entre su dominio catalítico y su dominio regulador. Esta ubiquitinación regula la interacción entre ambos dominios y la tasa de fosforilación del dominio catalítico (Al-Hakim et al., 2008). En AMPK el dominio de autoinhibición (AID), que se encuentra entre el dominio catalítico (KD) y el dominio regulador (RD), interacciona con el dominio catalítico en una conformación cerrada e inactiva. La fosforilación del residuo treonina 172 del dominio catalítico impide la interacción entre el dominio de autoinhibición y el catalítico generando una conformación abierta y activa (Pang et al., 2007). Para comprobar si la conformación abierta o cerrada de AMPK α 2 modifica su posible ubiquitinación, sometimos a ensayo de ubiquitinación por laforina-malina a dos mutantes puntuales de la treonina 172 de AMPK α 2: AMPK α 2-T172A, que no puede ser fosforilado y presenta conformación cerrada y AMPK α 2-T172D, que simula fosforilación constitutiva y conformación abierta. En la **Figura 31** se observa que el complejo laforina-malina poliubiquitina al mutante T172A (conformación cerrada) de manera menos eficiente, mientras que el mutante T172D (conformación abierta) es poliubiquitinado de manera más eficiente que el tipo silvestre de AMPK α 2. El revelado anti-HA indica que la carga de la resina de cobalto es igualitaria, ya que malina se autoubiquitina y ubiquitina también laforina (Gentry et al., 2005) y ambas se unen en igual medida a la resina de cobalto de AMPK α 2 (WT) y a la de los dos mutantes.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

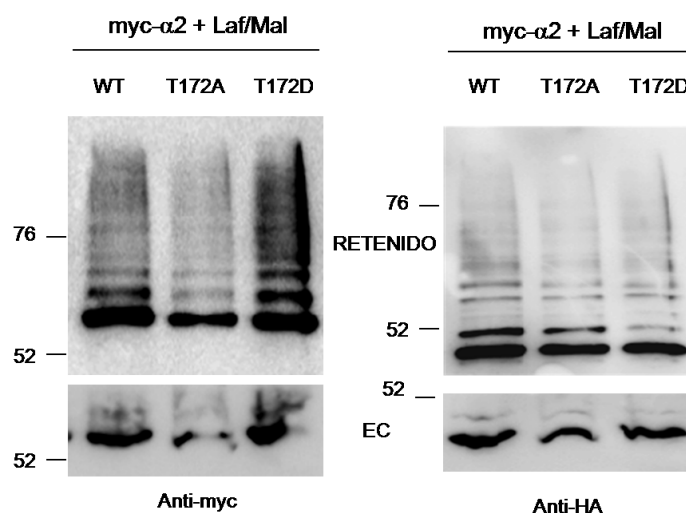


Figura 3I. La conformación abierta o cerrada de AMPK α 2 modifica su ubiquitinación por laforina-malina. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y dos mutantes puntuales de la treonina 172 de AMPK α 2: pCMV-myc-AMPK α 2-T172A y pCMV-myc-AMPK α 2-T172D en combinación con pCMV-HA-laforina (38 kDa) y pCDNA-HA-malina (43 kDa). A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos. A la izquierda revelado anti-myc que indica el estatus de poliubiquitinación de los diferentes mutantes. A la derecha control revelado con anti-HA que indica la expresión HA-laforina/HA-malina y la carga igualitaria de la resina de cobalto. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Estos resultados indican que la conformación abierta y activa (T172D) de AMPK α es más susceptible de ser poliubiquitinada por el complejo laforina-malina, que la conformación cerrada e inactiva (T172A).

5 Acción de laforina-malina sobre el complejo trimérico de AMPK

En este punto, comprobamos el efecto del complejo laforina-malina sobre las subunidades de AMPK cuando estas forman parte de un complejo trimérico estable. Para ello, sobreexpresamos AMPK α 2, AMPK β 2 y

II) Efecto de UPS sobre AMPK

AMPK γ 1 en células HEK293 que expresaban también el complejo laforina-malina. Como se observa en la **Figura 32 A**, cuando forman parte del complejo trimérico, ni AMPK α 2, ni AMPK γ 1 se poliubiquitinan mediante laforina-malina, mientras que en condiciones similares pero sobreexpresadas en solitario, ambas AMPK α 2 y AMPK γ 1 son modificadas. Sin embargo, AMPK β 2 sigue siendo ubiquitinada por el complejo laforina-malina incluso formando parte del complejo trimérico estable, aunque la poliubiquitinación es mucho más débil que la que sufre AMPK β 2 sobreexpresada en solitario.

Para confirmar estos resultados, analizamos si laforina-malina era capaz de modificar también al complejo AMPK endógeno. Para ello, sobreexpresamos el complejo laforina-malina junto con 6xHis-UB y comprobamos con anticuerpos específicos si formas poliubiquitinadas de las subunidades endógenas de AMPK se unían a la resina de cobalto. En la **Figura 32 B** se observa que solo la subunidad AMPK β endógena es modificada por el complejo laforina-malina, mientras que ni AMPK α ni AMPK γ 1 son modificadas.

Estos datos sugieren, por un lado, que AMPK α y AMPK γ son pobres sustratos de laforina-malina cuando forman parte del complejo trimérico AMPK. Por otro lado, que el efecto principal del complejo laforina-malina sobre AMPK está mediado por la poliubiquitinación de la subunidad AMPK β , ya que es modificada incluso formando parte del complejo trimérico endógeno.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

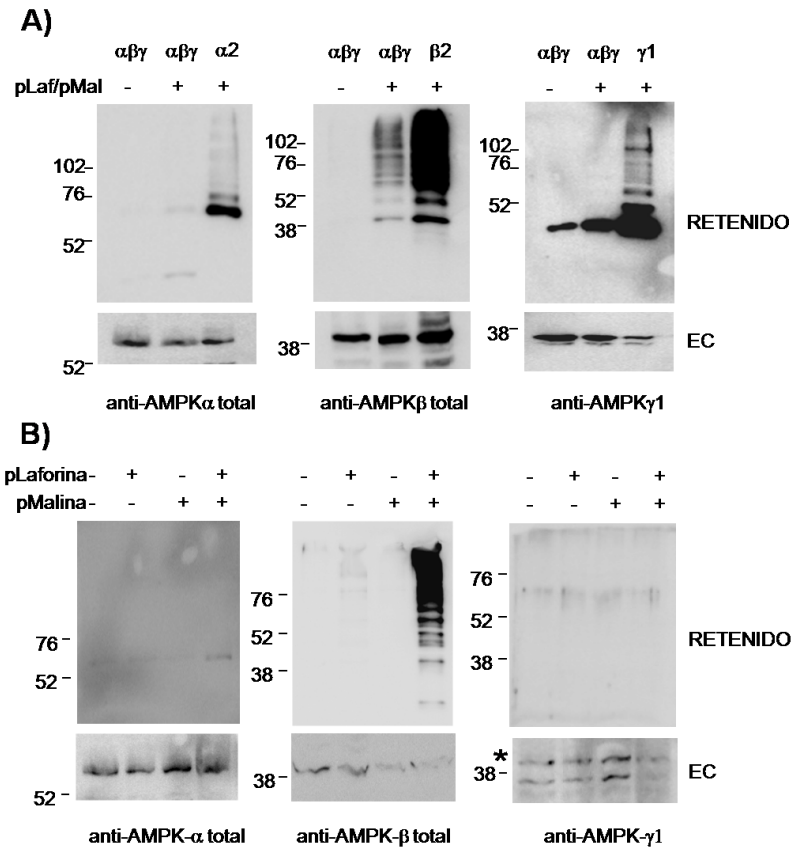


Figura 32. Acción del complejo laforina-malina en la ubiquitinación del complejo trimérico AMPK. A) En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y pCMV-myc-AMPK $\alpha 2$, pCMV-myc-AMPK $\beta 2$ y pCMV-myc-AMPK $\gamma 1$ conjuntamente o en solitario en combinación con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos. B) análisis de la ubiquitinación del complejo AMPK endógeno por acción de laforina-malina. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB en combinación con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina conjuntamente o en solitario. (* banda inespecífica). RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

6 Efecto de laforina-malina sobre la estabilidad de AMPK

Dado que una de las funciones principales del sistema UPS es la regulación de la degradación de proteínas mediante poliubiquitinación de sustratos para destrucción por el proteasoma, decidimos comprobar si el complejo laforina-malina afectaba la estabilidad de AMPK. Para ello sobreexpresamos las subunidades de AMPK (myc-AMPK α 2, myc-AMPK β 2 y myc-AMPK γ 1) de manera independiente en células que sobreexpresaban o no el complejo laforina-malina. 24 horas después de la transfección tratamos las células con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, y analizamos mediante SDS-PAGE la expresión de las subunidades de AMPK a los tiempos indicados hasta un máximo de 12 horas. En la **Figura 33** se puede observar que la vida media de las tres subunidades sobreexpresadas por separado está entre las 4 y las 6 horas, como ya se había señalado en trabajos anteriores (Crute et al., 1998). También se observa que en presencia de laforina-malina, ninguna de las subunidades acelera su degradación; por el contrario, AMPK β 2 y AMPK γ 1 parecen sufrir cierta estabilización.

Estos datos confirman la observación de que en presencia del complejo laforina-malina, AMPK β se detecta en mayores cantidades en los extractos crudos (**Figuras 27 y 30**). Esto parece indicar que cuando el complejo laforina-malina ubiquitina a AMPK β 2 esta sufre una estabilización.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

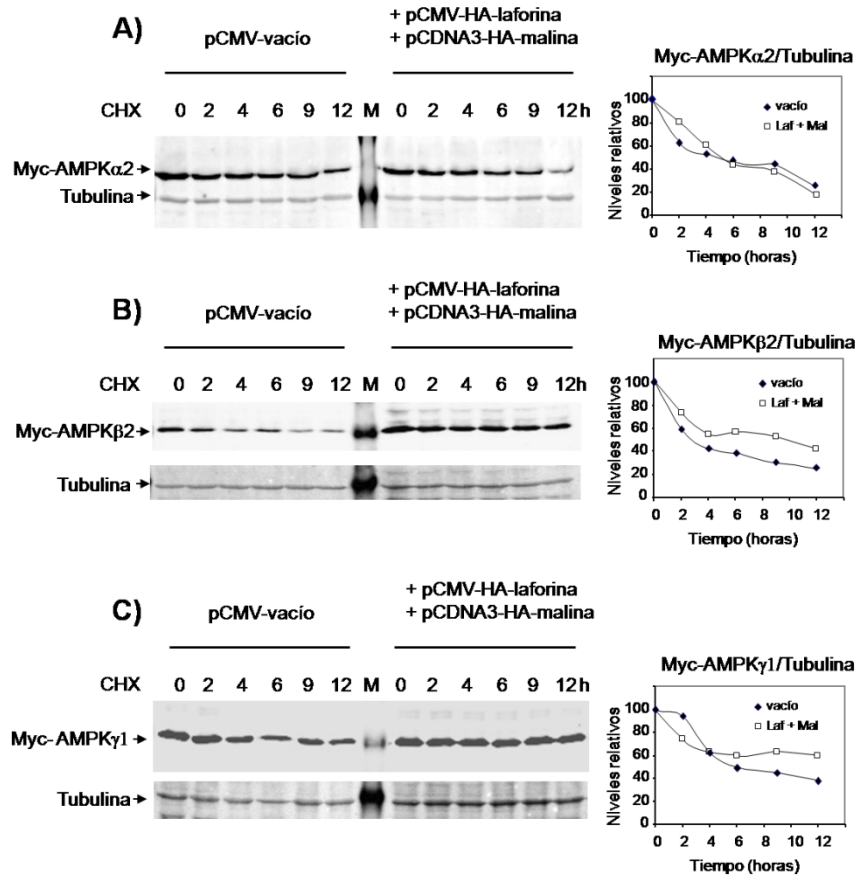


Figura 33. El complejo laforina-malina no acelera la degradación de las subunidades de AMPK. Sobreexpresamos las subunidades de AMPK (myc-AMPK α 2 (A), myc-AMPK β 2 (B) y myc-AMPK γ 1 (C)) de manera independiente en células HEK 293 que sobreexpresaban el complejo laforina-malina o un plásmido vacío como control (pCMV-myc-vacío). 24 horas después de la transfección tratamos las células con cicloheximida (355 μ M) y analizamos mediante SDS-PAGE y revelado con anti-myc la expresión de las subunidades de AMPK a los tiempos indicados hasta un máximo de 12 horas. La señal de cada subunidad se cuantifico y relativizó respecto de tubulina y se graficó en relación al tiempo para inferir la vida media aproximada. M: marcador de pesos moleculares.

7 Tipo de cadenas de ubiquitina introducidas por el complejo laforina-malina sobre AMPK

Como ya se ha apuntado, las cadenas de ubiquitina se generan por unión de moléculas de ubiquitina de manera sucesiva a alguno de los siete residuos de lisina que posee la ubiquitina ya anclada al sustrato (Pickart and Fushman, 2004). Del residuo utilizado en la ramificación dependerá el destino final del sustrato. Así, los tipos de poliubiquitinación más extendida se dan en la lisina K48 (que dirige a degradación proteasomal) y en la lisina K63 (que está implicada entre otras, en señalización, en tráfico y localización subcelular). Con el propósito de averiguar por qué la poliubiquitinación de las subunidades de AMPK por laforina-malina no se traduce en un aumento de la degradación de las mismas, decidimos analizar qué tipo de cadena introducían sobre AMPK. Para ello, sobreexpresamos en células HEK 293 unas construcciones mutantes de ubiquitina en las lisinas 48 y 63. Estas mutaciones de lisina a arginina (K48R y K63R) impiden la construcción de las cadenas de ubiquitina correspondientes. En primer lugar comprobamos la funcionalidad de los nuevos mutantes de ubiquitina en nuestro sistema experimental. Usamos p53 y su ubiquitina ligasa Mdm2, que poliubiquitina p53 regulándolo de manera compleja (Brooks and Wei, 2004). Como se observa en la **Figura 34 A**, Mdm2 promueve la poliubiquitinación de p53, tanto en presencia de ubiquitina silvestre (WT), como con las dos mutantes (K48R y K63R), aunque en menor proporción en el caso de K63R. A continuación se comprobó en HEK 293 que sobreexpresaban ubiquitina-K48R o ubiquitina-K63R, si la sobreexpresión de AMPK α 2 junto con laforina-malina presentaba diferencias respecto de las que sobreexpresaban ubiquitina-WT. Del mismo modo se procedió sobreexpresando AMPK β 2 o, directamente analizando el efecto de los mutantes sobre la ubiquitinación de AMPK β endógena. Como se observa en la **Figura 34 B-C**, en presencia del mutante K63R se observa una gran disminución de la ubiquitinación de tanto AMPK α 2 como AMPK β 2 por el complejo laforina-malina. Sin embargo, tanto en presencia de la ubiquitina silvestre como del mutante K48R se acumulan subunidades poliubiquitinadas de AMPK α 2 y AMPK β 2. En la **Figura 34 D** se puede ver como AMPK β endógena sigue un patrón similar al observado con la sobreexpresión de AMPK β 2.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

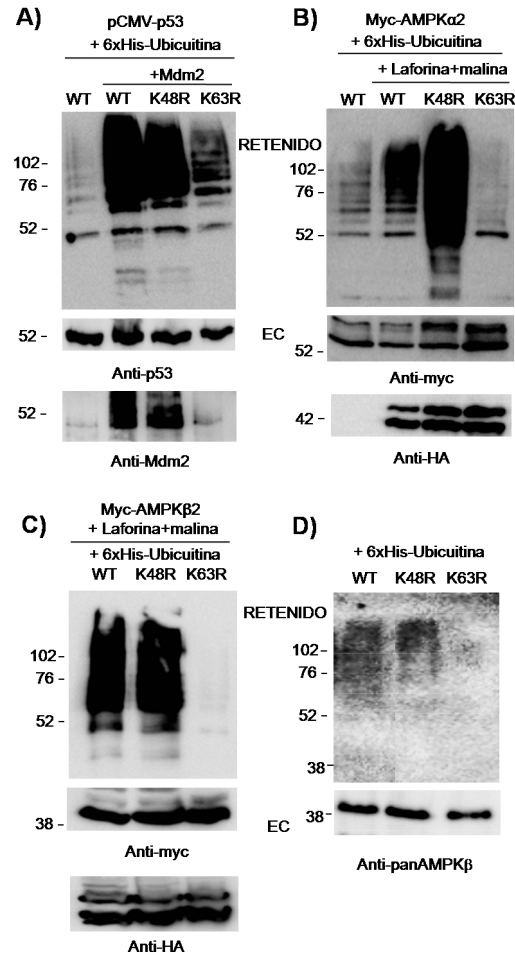


Figura 34. El complejo laforina-malina introduce ubiquitina con ramificación K63 sobre AMPK. **A)** Control de funcionamiento de mutantes de ubiquitina. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB-WT o 6xHis-UB-K48R o 6xHis-UB-K63R y pCMV-p53 con o sin pCDNA-Mdm2. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos. **B-C)** En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB-WT o 6xHis-UB-K48R o 6xHis-UB-K63R y pCMV-myc-AMPK (AMPK α 2 o AMPK β 2) en combinación con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina y se procedió como en (A). **D)** análisis de la ubiquitinación de

II) Efecto de UPS sobre AMPK

AMPK β endógena en las mismas condiciones que (A-C). RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Estos resultados indicaban que el complejo laforina-malina introduce ubiquitinas con ramificaciones K63 sobre las subunidades de AMPK estudiadas.

Para corroborar estos resultados, usamos unos anticuerpos que reconocen de manera específica poliubiquitinas con ramificación K48 o K63 (Newton et al., 2008). Generamos una construcción que expresaba AMPK β 2 fusionada en N-terminal a un epítipo de 6 residuos de histidina (6xHis-AMPK β 2), se transfectaron HEK293 con este constructo en presencia o ausencia del complejo laforina-malina y se efectuó la purificación por cromatografía de afinidad en columna de cobalto (Clontech). Tanto la fracción purificada como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelado con anticuerpos específicos anti-ubiquitina, anti-K48 y anti-K63. Como se observa en la Figura 35, mediante el anticuerpo anti-ubiquitina conjugados, en presencia de laforina-malina, 6xHis-AMPK β 2 presenta un mayor grado de ubiquitinación como cabría esperar. Este incremento en la ubiquitinación dependiente de laforina-malina se obtiene igualmente usando el anticuerpo específico de ramificación anti-K63, mientras que no es tan evidente con el anticuerpo anti-K48.

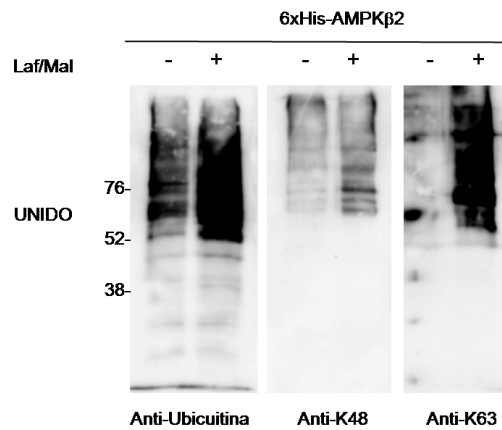


Figura 35. El complejo laforina-malina introduce ubiquitina con ramificación K63 sobre AMPK. Se transfectaron células HEK293 con 6xHis-AMPK β 2 en presencia o ausencia del complejo laforina-malina. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en

II) Efecto de UPS sobre AMPK

cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas 6xHis-AMPK β 2 fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada, como los extractos crudos fueron analizados mediante SDS-PAGE y revelados con anticuerpos específicos. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Todos estos resultados indican que el complejo laforina-malina introduce cadenas de ubiquitina de tipo K63 sobre AMPK α 2 cuando esta se encuentra libre. Además, el complejo laforina-malina introduce cadenas de ubiquitina de tipo K63 en AMPK β independientemente de su estatus oligomérico. Así pues laforina-malina mediaría sobre AMPK una regulación no degradativa.

8 Función de la poliubiquitinación K63 mediada por laforina-malina en AMPK.

Para confirmar que, efectivamente, AMPK β 2 se estabiliza en presencia del complejo laforina-malina comparamos su nivel de expresión con el existente en presencia de Cidea (*Cell death-inducing DFFA-like effector A*). Cidea es una proteína que promueve la degradación de AMPK β (Qi et al., 2008). En primer lugar, comprobamos que éramos capaces de reproducir que en presencia de Cidea se promovía la degradación de AMPK β 2. Para ello, sobreexpresamos myc-AMPK β 2 en células que sobreexpresaban o no Cidea. 24 horas después de la transfección tratamos las células con cicloheximida, y analizamos mediante SDS-PAGE la expresión de las subunidades de AMPK β 2 a los tiempos indicados. Como puede observarse en la **Figura 36 A**, Cidea promueve la rápida degradación de AMPK β 2. A continuación, comparamos el nivel de expresión de AMPK β 2 después de la transfección de células HEK293 con myc-AMPK β 2 sola o en combinación con laforina-malina o con Cidea. En la **Figura 36 B**, se observa cómo en presencia de Cidea existe un nivel de AMPK β 2 varias veces menor que en el control, mientras que en presencia del complejo laforina-malina el nivel de AMPK β 2 es varias veces superior al control.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

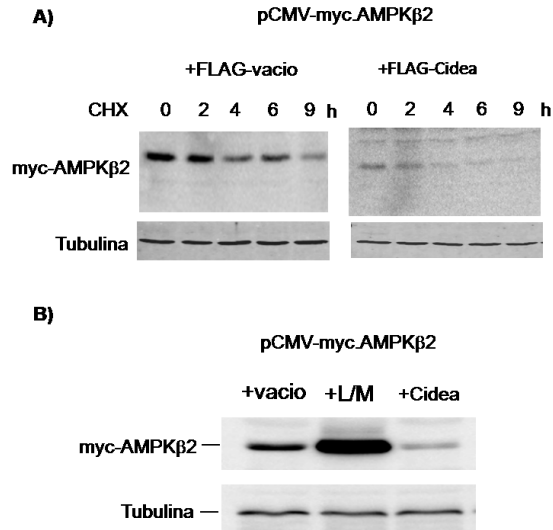


Figura 36. El complejo laforina-malina estabiliza AMPKβ2 mientras que Cidea promueve la degradación de AMPKβ2. **A)** Sobreexpresamos myc-AMPKβ2 en células HEK 293 que sobreexpresaban Cidea o un plásmido vacío como control (pFLAG-vacio). 24 horas después de la transfección tratamos las células con CHX (cicloheximida a 355 μM) y analizamos mediante SDS-PAGE y revelado con anti-myc la expresión de la subunidad de AMPK a los tiempos indicados. **B)** Sobreexpresamos myc-AMPKβ2 en células HEK 293 que sobreexpresaban Cidea o laforina-malina o un plásmido vacío (control). 24 horas después de la transfección analizamos mediante SDS-PAGE y revelado con anti-myc la expresión de AMPKβ2

Estos datos indican que AMPKβ2 queda estabilizada por acción del complejo laforina-malina, aunque es degradada eficientemente en presencia de Cidea, como ya se señalaba en (Qi et al., 2008).

Por otro lado comprobamos si la presencia del complejo laforina-malina afectaba a la actividad de AMPK *in vivo* en dos líneas celulares, HEK 293 y HeLa. En primer lugar transfectamos HEK 293 con o sin el par laforina-malina y comprobamos si ACC1 (acetil-CoA carboxilasa 1), una diana de AMPK que se usa como indicador de la actividad de ésta, se hallaba fosforilada. Como se puede ver en la **Figura 37**, en células HEK 293, el estado de activación de AMPK en presencia del complejo laforina-malina no

II) Efecto de UPS sobre AMPK

presenta diferencias significativas respecto de los controles. De manera similar que con HEK293, comprobamos si la sobreexpresión de laforina-malina en células HeLa afectaba a la actividad de AMPK. Como también se observa en la **Figura 37**, la actividad de AMPK en HeLa, que si se ve afectada tras un tratamiento de 10 minutos con TNF α (10 ng/mL), no se ve afectada por la presencia de laforina-malina.

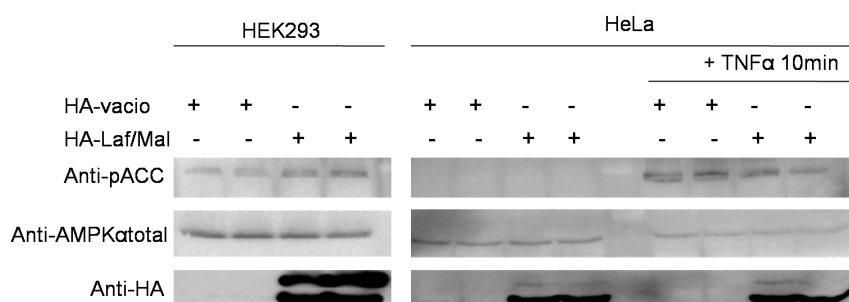


Figura 37. La presencia del complejo laforina-malina no afectaba a la actividad de AMPK en las líneas celulares HEK 293 y HeLa. Se trasfectaron ambas líneas con pCMV HA-vacio o con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina. A las 24 horas las células HeLa fueron tratadas o no con TNF α 10ng/mL durante 10 minutos y analizamos la expresión de AMPK α total, laforina-malina y el estado de fosforilación de ACC1 mediante SDS-PAGE y revelado con anticuerpos específicos.

Estos datos señalan que la poliubiquitinación de la subunidad AMPK β (que forma parte del complejo trimérico endógeno) mediada por laforina-malina, no se traduce en una mayor actividad de AMPK, al menos, en estas líneas celulares y sobre un sustrato estándar de AMPK como es ACC1.

Dado que, como apunta la bibliografía, la poliubiquitinación con ramificación K63 está implicada entre otras cosas, en localización subcelular de algunos de los sustratos a los que afecta, decidimos comprobar si en presencia de laforina-malina se daba un cambio en el reparto de las subunidades AMPK α y AMPK β entre núcleo y citoplasma. Para ello Se sembraron células HeLa sobre placas que contenían varios cubres de vidrio y fueron transfectadas con pCMV-HA-vacio o con pCMV-HA-laforina y pCDNA-HA-malina. A las 24 horas, se llevo a cabo el protocolo de inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios de anti-AMPK α total o

II) Efecto de UPS sobre AMPK

Anti-AMPK β total (Cell signalling) en combinación con anti-Laforina. Se usaron también los anticuerpos secundarios fluorescentes *Texas red* (anti-ratón, emisión máxima a 543 nm) y Alexa-fluor 488 (anti-conejo, emisión máxima a 488nm). Además se usó como tinción de núcleos la sonda fluorescente Topro 3 (emisión máxima a 600 nm). Después, se procedió a la toma de imágenes con microscopio confocal y al análisis de las mismas. Como se observa en la **Figura 38 A**, no existe una diferencia significativa de localización entre núcleo y citoplasma de la subunidad AMPK α en presencia o ausencia del complejo laforina-malina. En la **Figura 38 B**, se muestra que existe una mayor relación de fluorescencia entre núcleo y citoplasma debida a la subunidad AMPK β en presencia del complejo laforina-malina.

II) Efecto de UPS sobre AMPK

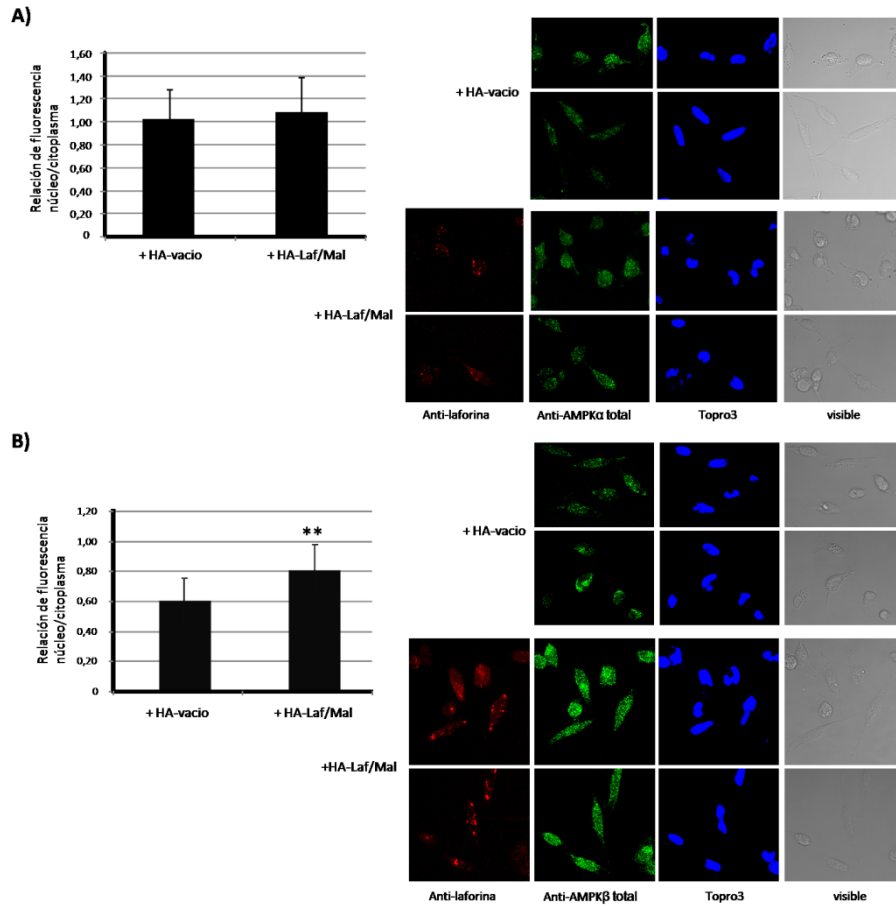


Figura 38. El complejo laforina-malina induce un incremento de la localización nuclear de AMPK β pero no de AMPK α . Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos pCMV-HA-laforina y pcDNA3-HA-malina (HA-Laf/pMal). A las 24 horas, se llevó a cabo el protocolo de inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios de anti-AMPK α total (A) o Anti-AMPK β total (B) generados en conejo (Cell signalling), en combinación con anti-Laforina generado en ratón (Santa Cruz). Se usaron los anticuerpos secundarios fluorescentes *Texas red* (anti-ratón, emisión máxima a 543 nm) y Alexa-fluor 488 (anti-conejo, emisión máxima a 488nm), además se usó como tinción de núcleos la sonda fluorescente Topro 3 (emisión máxima a 600 nm). Después, se procedió a la toma de imágenes de microscopio confocal Leica TCS/SP2 y al análisis de las mismas usando el programa ImageJ. Los gráficos indican las relaciones de fluorescencia entre núcleo y citoplasma debida los anticuerpos primarios anti-AMPK α total (A) o Anti-AMPK β total (B) en ausencia

II) Efecto de UPS sobre AMPK

(HA-vacio) o presencia de laforina-malina (HA-Laf/Mal). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas con $^{**}p < 0,01$ (n: 50).

Estos resultados indican que la modificación por poliubiquitinación dependiente de laforina-malina de la subunidad AMPK β se traduce en una acumulación nuclear de la misma. En cambio, la subunidad AMPK α no presenta diferencias de acumulación respecto al control, ya que como se ha mostrado anteriormente, cuando esta forma parte del complejo trimérico, el complejo laforina-malina no la poliubiquitina.

Discusión

DISCUSIÓN

Como se ha mencionado en la introducción, tanto AMPK como el sistema UPS parecen ser mecanismos de extrema importancia en la regulación de estatus de la célula. Basándonos en el hallazgo previo de nuestro laboratorio de que la subunidad AMPK β interaccionaba por doble híbrido con la subunidad PSMD11 (26S *proteasome non-ATPase regulatory subunit 11*) de la partícula 19S del proteasoma humano, hemos profundizado en el estudio de la relación entre AMPK y el sistema UPS. Este estudio se ha realizado desde dos puntos de vista. Primero hemos analizado la acción de AMPK sobre la actividad proteolítica del proteasoma mediante el estudio de su relación con PSMD11, y además hemos caracterizado la actividad inhibitoria del proteasoma que presenta un activador específico de AMPK, el A-769662. En segundo lugar hemos analizado la acción que el sistema UPS tiene sobre AMPK. Nos hemos centrado en el estudio de la acción de la E3 ubiquitina ligasa Malina junto con la fosfatasa dual Laforina sobre las subunidades y la actividad de AMPK, dado que nuestro laboratorio ha definido recientemente una relación funcional entre AMPK y un complejo formado por laforina-malina (Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009).

DISCUSIÓN

1 Efecto de AMPK sobre el proteasoma

1.1 PSMD11

PSMD11 (Rpn6 en levaduras) es esencial para el ensamblaje del Lid de la partícula reguladora 19S, ya que su ausencia evita la incorporación de Rpn3, Rpn7, Rpn12, y Rpn15 (Isono et al., 2005). Además, parece ser que la abundancia de Rpn6 es subestequiométrica respecto a la cantidad de 19S (Sharon et al., 2006). Dada su subestequiometría e importancia para el ensamblaje del Lid, se ha propuesto que PSMD11 (Rpn6) podría tener un papel regulador de la actividad del proteasoma 26S en el sentido de poder modular el reconocimiento y la desubicitinación ocultando o exponiendo determinados sitios activos o de reconocimiento presentes en el Lid (Sharon et al., 2006).

El primer paso para comprobar si AMPK tenía algún tipo de acción sobre el proteasoma fue corroborando y cuantificando, la interacción hallada en un escrutinio de doble híbrido entre AMPK β 2 y PSMD11. Los ensayos de cuantificación de la interacción por doble híbrido entre PSMD11 y las subunidades AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1 indicaron que, efectivamente, PSMD11 interacciona de manera importante con AMPK β 2. Además, hemos comprobado que PSMD11 también interacciona por doble híbrido con AMPK α 2, aunque de manera mucho más débil. Ambas interacciones han sido confirmadas en un sistema de co-inmunoprecipitación en células de mamífero. Por otra parte, esta interacción es bastante específica, ya que hemos comprobado, por doble híbrido, que la interacción entre AMPK β 2 y PSMD11 no depende únicamente de la presencia en PSMD11 del dominio PCI (*Proteasome*, *COP9*, *eIF3*), ya que una forma truncada de PSMD11 que contiene el dominio PCI (residuos 312-422) interacciona con AMPK β 2 con una intensidad que es 3 veces menor que con la forma completa (residuos 1-422) y además, otras proteínas que lo presentan, como algunas subunidades del Lid (PSMD12 y PSMD13) o como CSN2 (del complejo COP9/signalosoma) que es paróloga de PSMD11, no interaccionan con AMPK β 2 (Tablas 6 y 7. Figuras 11 y 12).

A continuación, y dado que AMPK es una serina/treonina quinasa, comprobamos que PSMD11 era fosforilado por AMPK tanto *in vitro* (Figura

13) como *in vivo* (Figura 15). No obstante no fuimos capaces de determinar el residuo implicado a pesar de haber construido 4 mutantes puntuales de serina a alanina en las serinas 14, 79, 272 y 366, que forman parte de secuencias consenso de fosforilación por AMPK, y como puede observarse en la Figura 14, están muy conservadas entre levaduras y humanos. Todos los mutantes sufrían fosforilación *in vitro*, aunque menor a la del tipo silvestre. Dado que AMPK fosforila en un único residuo a PSMD11, ello indica que los residuos mutados no están implicados en esta fosforilación. El descenso de señal en todos los mutantes podría deberse a que la mutación de cada uno de los residuos de serina señalados podría alterar la estructura de PSMD11 lo suficiente como para que AMPK no pudiera fosforilar a los mutantes como lo hace con la forma silvestre. También hemos intentado determinar el sitio de fosforilación *in vivo* mediante espectrometría de masas, expresando en células HEK293 una construcción His-PSMD11 en condiciones de activación de AMPK (adicionando fenformina). Sin embargo, ninguno de los péptidos de PSMD11 identificados presentaba fosforilación.

El paso siguiente era comprobar si la actividad proteolítica del proteasoma se veía afectada por las condiciones de activación de AMPK en células de mamífero. Para ello, decidimos estudiar si la activación farmacológica de AMPK endógena influía en la actividad proteolítica del proteasoma (Figuras 16 a 18). Usamos dos líneas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs; *mouse embryonic fibroblast*), una de tipo silvestre y otra de dobles mutantes que carecen de las subunidades AMPK α 1 y AMPK α 2 (α 1 $^{-/-}$ y α 2 $^{-/-}$). Partíamos de la hipótesis de que si un fármaco modulaba la actividad proteasomal mediante la acción de AMPK en los MEFs de tipo silvestre, este fármaco no tendría efecto en los MEFs dobles mutantes. Así, observamos que dos activadores ampliamente utilizados de AMPK, como son AICAR (0,5mM) y metformina (2mM), producen una reducción de la actividad proteasomal cercana al 20% en MEFs silvestres pero no en dobles mutantes. Ello indica que AMPK modula la actividad proteolítica proteasomal. La acción de AMPK generando un descenso de la actividad proteolítica del proteasoma podría estar mediada por la fosforilación de PSMD11. Así, AMPK podría participar en el control metabólico de la función proteasomal, en la misma dirección pero en diferente sentido al que se ha descrito recientemente para otra quinasa, la PKA (*Protein kinase A*). La PKA, mediante fosforilación de la serina 120 de la

DISCUSIÓN

subunidad Rpt6 de la Base de la partícula 19S, incrementa la actividad proteolítica del proteasoma (Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b). La bajada de actividad del proteasoma en condiciones de activación de AMPK es consistente con la función reguladora que cumple AMPK como guardián energético, ya que AMPK se activa de manera muy sensible cuando la relación AMP/ATP empieza a aumentar. En primer lugar, la proteólisis dependiente de proteasoma es un consumidor importante de ATP, y en condiciones donde empieza a verse comprometida la cantidad de energía necesaria para la célula, un descenso en la proteólisis podría ayudar a mantener los niveles energéticos. En segundo lugar, este descenso en la actividad proteasomal puede ser un buen apoyo para alargar la vida de proteínas imprescindibles en algunos procesos celulares, dada la concomitante inhibición de la síntesis de proteínas que AMPK ejerce en estados de baja energía mediante la inhibición de la elongación de la traducción y de la cascada de mTOR (**Figura 39**). Por otro lado no debemos olvidar que el proteasoma o sus subcomplejos (19S y 20S) también están implicados en la regulación de la expresión génica. Nosotros nos hemos centrado en el estudio de la acción de AMPK sobre la actividad proteolítica del proteasoma, pero es posible que la fosforilación de PSMD11 esté implicada en la regulación de estas otras actividades del proteasoma menos canónicas.

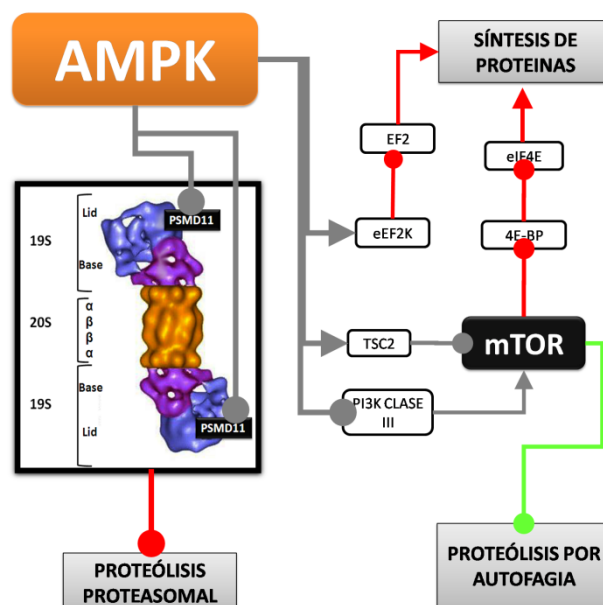


Figura 39. Acción directa de AMPK sobre el metabolismo de proteínas. Las puntas de flecha indican activación y los círculos inhibición. El color rojo efecto final inhibitorio sobre el proceso subyacente. El color verde efecto final activador sobre el proceso subyacente. eIF4E, *eukaryotic initiation factor 4E*. eEF2K, *eukaryotic elongation factor 2 kinase*. mTOR, *mammalian target of rapamycin*. TSC2, *tuberous sclerosis complex 2*.

1.2 A-769662

El A-769662 presenta una capacidad de activación de AMPK, potente, reversible, y muy específica (Goransson et al., 2007). El mecanismo molecular por el que A-769662 activa AMPK no está claro, pero se sabe que no está mediado por el aumento en la relación AMP/ATP, ni tampoco parece unirse a la subunidad AMPK γ como lo haría el AMP. Se ha observado que A-769662 activa AMPK de manera alostérica y también por inhibición de la desfosforilación de la treonina 172 de AMPK α . Parece que su acción está mediada por su unión a AMPK β (Sanders et al., 2007a).

Nuestros estudios demuestran que A-769662 es capaz de inhibir la actividad del proteasoma por un mecanismo independiente de AMPK, ya

DISCUSIÓN

que esta inhibición sigue presente en MEFs que no contienen ninguna de las subunidades catalíticas de AMPK.

Como ya se ha apuntado, dado que la inhibición de la actividad del proteasoma no se encontraba entre las características ya descritas de A-769662, decidimos profundizar en el estudio de su actividad inhibitoria. En primer lugar, confirmamos esta inhibición del proteasoma, mediante otros indicadores como la acumulación de proteínas poliubicitinadas o reporteros GFPu-1. Observamos que A-769662 inhibía la actividad proteasomal durante al menos 24 horas y que ésto no era efecto de la inhibición de transcripción o traducción de subunidades proteasomales. Además, también confirmamos que este efecto inhibitorio se hacía extensivo a otra línea celular como células HEK 293-GFPu-1 (**Figura 19**).

El siguiente paso fue determinar la IC₅₀ de A-769662 sobre la actividad del proteasoma (**Figura 20**). El IC₅₀ muestra la concentración a la que un agente químico genera una inhibición de actividad del 50%, y se usa como un indicador para comparar potencias de inhibición entre diferentes fármacos. Así, determinamos que la IC₅₀ de A-769662 sobre la actividad del proteasoma es de 47 μ M en MEFs doble KO y de 62 μ M en MEFs de tipo silvestre, esto indica que el efecto de A-769662 es de al menos un orden de magnitud menor que el de un inhibidor proteasomal muy potente, como la lactacistina, cuya IC₅₀ está en rango nanomolar.

Comprobamos asimismo que el efecto inhibitorio de A-769662 sobre el proteasoma se da de manera reversible y con independencia del estado de activación de este último (**Figura 20**). Ello sugiere que A-769662 tiene un efecto directo sobre el proteasoma.

A continuación, y dado que el proteasoma está compuesto mayoritariamente de un núcleo catalítico 20S (que presenta las actividades de tipo proteasa) y de una o dos partículas reguladoras 19S (que median el desplegamiento y el paso del sustrato al núcleo), determinamos el nivel de actuación de A-769662 sobre el proteasoma. Los ensayos *in vitro* de actividad proteasomal revelaron que A-769662 es capaz de inhibir la actividad del proteasoma 26S pero no la del proteasoma 20S (**Figura 22**). Adicionalmente, comprobamos que la acción inhibitoria de A-769662 no se daba por disrupción de la interacción entre el núcleo catalítico 20S y la partícula

reguladora 19S (**Figura 23**). Por tanto la acción de A-769662 se centra en inhibir la partícula reguladora 19S. Este mecanismo de inhibición es diferente de las acciones del resto de inhibidores proteasomales descritos hasta el momento, que afectan únicamente a las actividades catalíticas del núcleo catalítico 20S.

No obstante, no hemos podido identificar la diana concreta de A-769662 dentro de la partícula reguladora 19S, pero su acción debe estar encaminada a impedir la entrada de los sustratos dentro del núcleo catalítico 20S por inhibición de alguno de los pasos necesarios para ello. Ésto podría ocurrir si A-769662 impidiese el reconocimiento de sustratos poliubiquitinados (por Rpn 1, 2, 10 y 13, (Tanaka, 2009)) o la acción de alguna de las subunidades encargadas de la desubiquitinación del sustrato [UBP6 y Uch 37 (Tanaka, 2009)]. No obstante, la inhibición de las actividades DUB parece poco probable, ya que como se observa en los ensayos *in vitro* con proteasomas purificados 26S, A-769662 inhibe la proteólisis del sustrato FITC-caseína, el cual puede ser degradado por el proteasoma sin estar poliubiquitinado. Lo más probable es que A-769662 impida la acción de alguna de las subunidades ATPasa que forman parte de la Base del complejo 19S, que están implicadas en el desplegamiento del sustrato [Rpt1 a Rpt6, (Finley, 2009)] o en la apertura del canal por el que pasa la proteína hacia el núcleo catalítico [Rpt2 y Rpt5, (Rabl et al., 2008; Smith et al., 2007)].

Finalmente, aunque previamente se había descrito que A-769662 no tenía efecto tóxico medible en hepatocitos (Cool et al., 2006), nosotros pudimos determinar que la adición de A-769662 presentaba efectos tóxicos sobre la viabilidad celular de MEFs. Estos sufren un incremento de la necrosis de las células en cultivo alrededor de 4 veces tras la adición de A-769662 (**Figura 24**). Esta contradicción puede explicarse, por diferencias en el tipo celular, la dosis de inhibidor usado y el tiempo de tratamiento (Meiners et al., 2008). Por otro lado, la detención de la actividad del proteasoma generada por A-769662 causa arresto del ciclo celular (**Figura 25**), que es consistente con su acción inhibitoria del proteasoma ya que éste lleva a cabo la degradación de proteínas reguladoras de ciclo celular, como la mayoría de las ciclinas, y actúa como pieza clave manteniendo un balance crítico entre proteínas pro- y anti-apoptóticas (Konstantinova et al., 2008).

DISCUSIÓN

Así pues, parece que la adición de A-769662 genera una detención del ciclo celular evitando que éste progrese adecuadamente, y provocando un descenso de la viabilidad del cultivo.

Dado que A-769662 se ha perfilado como una excelente herramienta para el estudio de AMPK, todo lo anterior ha de tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos con este compuesto, ya que hemos demostrado que es capaz de inhibir al proteasoma por un mecanismo independiente de AMPK, a concentraciones similares a las utilizadas para generar activación de AMPK. Esta inhibición afecta, como mínimo, la viabilidad y el ciclo celular, que son solo dos procesos del amplio abanico en el que participa el proteasoma.

2 Efecto de UPS sobre AMPK

Muchas proteínas celulares son moduladas y degradadas por la maquinaria del sistema UPS (UPS; *ubiquitin proteasome system*). La regulación de la estabilidad de las subunidades de AMPK podría ser un modo adicional de regulación sobre su actividad. Ya había sido observado que la sobreexpresión de las tres subunidades de AMPK de manera conjunta hacía que presentasen una vida media de alrededor de 13 horas, mientras que si se sobreexpresaban en solitario, la vida media era tan solo de aproximadamente 6 horas (Crute et al., 1998). Por otro lado, existían indicios de que AMPK se ubiquitinaba (Al-Hakim et al., 2008). Además, en nuestro laboratorio se había definido una relación funcional entre AMPK y un complejo formado por laforina (una fosfatasa de tipo dual) y malina (una E3 ubiquitina ligasa) (Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009). Todo ello nos hizo profundizar en el estudio de la posible modulación de AMPK por parte del sistema UPS.

En primer lugar estudiamos si bajo el efecto de un inhibidor específico del proteasoma como el MG132 se acumulaban formas poliubiquitinadas de las subunidades de AMPK (**Figura 26**). Pudimos observar que cuando las subunidades se expresaban por separado, todas ellas (AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1) acumulaban formas poliubiquitinadas en presencia de MG132. Sin embargo cuando las tres subunidades de AMPK

formaban parte del complejo trimérico endógeno, AMPK α y AMPK γ eran menos susceptibles de ser poliubiquitinadas. Ya que MG132 es un inhibidor del proteasoma, la acumulación de formas poliubiquitinadas de AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1 cuando se expresan por separado podría indicar que sufren degradación dependiente de proteasoma. Esta degradación dependiente de proteasoma sería menor para AMPK α y AMPK γ cuando forman parte del complejo trimérico AMPK.

Una de las características principales del sistema UPS es que la transferencia de ubiquitina a proteínas diana es una reacción de tres pasos que catalizan tres enzimas (E1, E2 y E3). El último de los pasos, la unión de ubiquitina al sustrato, es realizado por E3 ubiquitina ligasas. Habiendo comprobado que AMPK es susceptible de sufrir ubiquitinación, enfocamos nuestro estudio hacia el posible efecto modulador que el par laforina-malina (a través de la actividad E3-ubiquitina ligasa de malina), pudiese tener sobre AMPK. Observamos que la sobreexpresión conjunta de laforina y malina promueve la poliubiquitinación de las subunidades AMPK α 1, AMPK α 2, AMPK β 1, AMPK β 2 y AMPK γ 1 expresadas individualmente. (Figura 27 y 29). Confirmamos también que la poliubiquitinación observada no es efecto inespecífico de la sobreexpresión de E3 ubiquitina ligasas, ya que en ausencia de laforina, malina no actuaba (Figura 27), y además, otra E3 ubiquitina ligasa de tipo RING como Mdm2 [relacionada con la poliubiquitinación de p53 (Brooks and Wei, 2004)] tampoco poliubiquitinaba ninguna de las subunidades de AMPK en el grado en el que lo hace el complejo laforina-malina (Figura 28).

Estos datos confirman la observación previa de nuestro laboratorio de que malina necesita a laforina para formar un complejo funcional (Solaz-Fuster et al., 2008). En este complejo laforina recluta sustratos para que malina ejerza sobre ellos su actividad E3-ubiquitina ligasa. De este modo, el par laforina-malina promueve la modificación por ubiquitinación de las tres subunidades de AMPK.

A continuación, intentamos mapear las regiones de AMPK α 2 y AMPK β 2 relacionadas con la ubiquitinación dependiente del complejo laforina-malina (Figura 30). Para ello usamos dos formas truncadas de cada subunidad. En el caso de la subunidad AMPK α 2 encontramos, que tanto el

DISCUSIÓN

dominio quinasa (KD), como el dominio regulador (RD) son necesarios para que el complejo laforina-malina actúe sobre AMPK α 2 ubiquitinándola. Estos resultados apoyan un estudio reciente que señala que otras quinasas de la familia de AMPK son ubiquitinadas en una región que se encuentra entre el dominio catalítico y el dominio regulador (Al-Hakim et al., 2008). En esos casos, la ubiquitinación modula la manera en que el dominio catalítico y el dominio regulador interaccionan para modificar el estado de actividad del enzima al afectar la tasa de fosforilación del dominio catalítico. En el caso de AMPK β 2 tampoco parece existir una modificación eficiente por parte de laforina-malina de las formas truncadas ensayadas (residuos 1-185 o residuos 186-271) por lo que concluimos que es necesaria la forma completa de AMPK β 2 para generar un motivo que sea ubiquitinado de manera eficiente por el complejo laforina-malina.

En AMPK α el dominio de autoinhibición (AID), que se encuentra entre el dominio catalítico (KD) y el dominio regulador (RD), interacciona con el dominio catalítico en una conformación cerrada e inactiva. La fosforilación del residuo treonina 172 del dominio catalítico impide la interacción entre el dominio de autoinhibición y el catalítico generando una conformación abierta y activa (Pang et al., 2007). Dados los resultados anteriores, comprobamos que la ubiquitinación de AMPK α por laforina-malina se ve afectada por el estado de fosforilación del residuo treonina 172 del dominio (**Figura 31**). Nuestros resultados indicaban que la presencia de una carga negativa en el residuo treonina 172 incrementa la poliubiquitinación de AMPK α 2 mediada por laforina-malina, probablemente porque la conformación abierta favorecida por la carga negativa en este residuo genera una conformación que hace que AMPK α 2 sea más susceptible a la modificación por laforina-malina.

Llegados a este punto, estudiamos si el complejo laforina-malina afectaba de manera similar a las subunidades de AMPK si forman parte del complejo trimérico estable. En primer lugar pudimos observar que cuando las subunidades forman parte del complejo trimérico, ni AMPK α , ni AMPK γ se poliubiquitinan por laforina-malina. Sin embargo, AMPK β sigue siendo ubiquitinada por el complejo laforina-malina incluso formando parte de este complejo trimérico estable (**Figura 32**). Estos datos sugieren, por un lado, que AMPK α y AMPK γ son pobres sustratos de laforina-malina cuando

forman parte del complejo trimérico AMPK. Por otro lado, también indican que el efecto principal del complejo laforina-malina sobre AMPK está mediado por la poliubiquitinación de la subunidad AMPK β , ya que es modificada incluso formando parte del complejo trimérico endógeno. Recordemos que algo similar ocurría cuando estudiamos la acumulación de formas poliubiquitinadas de subunidades de AMPK tras inhibir el proteasoma con MG132. Estos datos en conjunto parecen sugerir, que la regulación de AMPK por ubiquitinación está centrada sobre la modificación de la subunidad AMPK β .

Ya se había descrito que la vida media de las tres subunidades de AMPK sobreexpresadas por separado era de aproximadamente 6 horas, mientras que formando parte del complejo trimérico era de alrededor de 13 horas (Crute et al., 1998). Dado que una de las funciones principales del sistema UPS es la regulación de la degradación de proteínas mediante poliubiquitinación de sustratos para destrucción por el proteasoma, parecía plausible que la poliubiquitinación de las subunidades libres por acción del complejo laforina-malina fuese una señal degradativa. Sin embargo, pudimos comprobar que el complejo laforina-malina no acelera la degradación de ninguna de las subunidades y, por el contrario, AMPK β 2 y AMPK γ 1 parecen sufrir cierta estabilización (**Figura 33**). Estos datos explicaban la observación de que en presencia del complejo laforina-malina, AMPK β 2 se detecta en mayores cantidades en los extractos crudos en la mayoría de experimentos realizados hasta el momento (**Figuras 27 y 30**). Una prueba adicional del hecho de que laforina-malina estabilizan la subunidad AMPK β 2, es que realizan una acción opuesta a Cidea (*Cell death-inducing DFFA-like effector A*), una proteína que acelera su degradación (**Figura 36**). Cidea es una proteína no E3 ubiquitina ligasa que promueve eficientemente la degradación de AMPK β (Qi et al., 2008). Esto ocurre, según los autores, por el reclutamiento por parte de Cidea de alguna ubiquitina ligasa desconocida, que ubiquitina a AMPK β en su parte C-terminal (residuos 231-248) y la etiqueta para degradación. Ya hemos visto que el complejo laforina-malina es incapaz de ubiquitinar de manera eficiente las dos formas truncadas de AMPK β 2, que eran similares a las usadas en el estudio de Cidea. Por tanto, es plausible pensar que la poliubiquitinación de AMPK β por Cidea difiere en posición o tipo de ramificación de la poliubiquitinación

DISCUSIÓN

que ejecuta laforina-malina, la cual se traduce en una estabilización de AMPK β 2.

Una manera alternativa de poder determinar cuál es la función de la poliubiquitinación introducida por laforina-malina en AMPK, es determinar qué tipo de cadena poliubiquitinada se genera. Las cadenas de ubiquitina se generan por unión de moléculas de ubiquitina de manera sucesiva a alguno de los siete residuos de lisina que posee la ubiquitina ya anclada al sustrato (Pickart and Fushman, 2004). Los tipos de poliubiquitinación más extendida se dan en la lisina K48 (que dirige a degradación proteasomal) y en la lisina K63 (que está implicada entre otras, en señalización, activación de quinasas, en tráfico y localización subcelular). Pudimos determinar que el complejo laforina-malina introduce cadenas de ubiquitina de tipo K63 sobre AMPK α 2 cuando ésta se encuentra libre. Determinamos igualmente, mediante varias estrategias, que laforina-malina introduce cadenas de ubiquitina de tipo K63 en AMPK β independientemente de su estatus oligomérico (Figuras 34 y 35). Todo esto era consistente con el hecho de que laforina-malina no acelerase la degradación de la subunidad AMPK β , sino que más bien la estabilizara.

A continuación estudiamos el efecto de la poliubiquitinación en K63 sobre la funcionalidad del complejo AMPK, en primer lugar observamos que esta modificación no afectaba la actividad total AMPK de la célula. Se sabe que la poliubiquitinación con uniones K63 está implicada en regulación de cascadas de señalización, tráfico y localización intracelular, entre otros eventos (Glickman and Ciechanover, 2002; Pickart and Fushman, 2004). Consistente con este modo de acción pudimos observar que laforina-malina incrementa la localización nuclear de AMPK (Figura 38), aunque la subunidad AMPK α no presenta diferencias de localización, ya que como se ha mostrado anteriormente, cuando esta forma parte del complejo trimérico, laforina-malina no la poliubiquitina (Figura 38). Estos resultados son coherentes con demostraciones recientes sobre distribuciones subcelulares diferenciales de las subunidades de AMPK (Bendayan et al., 2009; Kodiha et al., 2007).

DISCUSIÓN

En resumen, por un lado hemos observado que las tres subunidades de AMPK son sensibles al sistema UPS, dado que sufren poliubiquitinación. El hecho de que las subunidades libres AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1 se acumulen como formas poliubiquitinadas en respuesta a un inhibidor específico del proteasoma como el MG132, parece indicar que son susceptibles de ser degradadas por el proteasoma. Además, el hecho de que cuando AMPK α , AMPK β y AMPK γ forman parte del complejo trimérico endógeno, solo se acumulen formas poliubiquitinadas de AMPK β , parece indicar que la regulación que el sistema UPS ejerce sobre AMPK se realiza a través de AMPK β . Dada la gran complejidad del sistema UPS y la gran cantidad de E3 ubiquitina ligasas existentes será necesario un estudio posterior a fin de determinar qué E3 ubiquitina ligasas están implicadas en la poliubiquitinación degradativa de las subunidades de AMPK. Por otro lado, las subunidades de AMPK pueden ser modificadas por otras E3 ubiquitina ligasas, como el complejo laforina-malina, que generen formas poliubiquitinadas no relacionadas con degradación proteolítica.

La habilidad de la subunidad AMPK β para ser ubiquitinada añade una nueva función a esta subunidad, a las que se han descrito recientemente: a) AMPK β es capaz de regular la actividad de todo el complejo AMPK en función de la cantidad y las características del glucógeno presente en la célula (McBride et al., 2009); b) AMPK β se requiere para la función del nuevo activador de AMPK A-769662 (Sanders et al., 2007a). Estos resultados subrayan el hecho de que AMPK β no debe de ser considerada como una mera subunidad de andamiaje si no como una subunidad que juega un papel importante en la regulación del complejo heterotrimérico.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1) AMPK interacciona físicamente con PSMD11, una subunidad no ATPasa del Lid del proteasoma, y modifica su estado de fosforilación.
- 2) La activación de AMPK por AICAR o metformina produce un descenso de la actividad del proteasoma. Por tanto, la activación de AMPK inhibe la actividad proteasomal.
- 3) A-769662, un activador muy específico de AMPK, produce un descenso de la actividad proteolítica del proteasoma de manera independiente de AMPK. Esto provoca efectos tóxicos sobre la viabilidad de las celular y genera la detención del ciclo celular. Este efecto secundario debe ser tenido en cuenta en los estudios en los que se utilice A-769662 como un activador farmacológico de AMPK.
- 4) A-769662 actúa, de manera reversible, inhibiendo alguna de las funciones de la partícula reguladora 19S de proteasoma, lo que define un nuevo mecanismo de acción en la inhibición de la actividad de este complejo proteolítico.
- 5) El complejo laforina-malina poliubiquitina las subunidades AMPK α 2, AMPK β 2 y AMPK γ 1 cuando están libres en la célula, o AMPK β cuando forma parte de un complejo trimérico estable.
- 6) La poliubiquitinación de laforina-malina sobre AMPK α 2 y AMPK β 2 presenta uniones de tipo K63.
- 7) La modificación que introduce laforina-malina sobre AMPK β produce un aumento de la estabilidad proteica y un incremento de su localización nuclear.
- 8) La subunidad AMPK β es una proteína diana de actuación de diferentes E3 ubiquitina ligasas. Dependiendo del tipo de E3 la poliubiquitinación puede etiquetarla para su degradación, o puede tener funciones no proteolíticas, como en el caso de la modificación introducida por el complejo laforina-malina.

Bibliografía

- Al-Hakim, A.K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Pegg, M. and Alessi, D.R. (2008) Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys29/Lys33-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*, 411, 249-260.
- Beg, Z.H., Allmann, D.W. and Gibson, D.M. (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 54, 1362-1369.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 292, 1552-1555.
- Bendayan, M., Londono, I., Kemp, B.E., Hardie, G.D., Ruderman, N. and Prentki, M. (2009) Association of AMP-activated Protein Kinase Subunits With Glycogen Particles as Revealed In Situ by Immunoelectron Microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, en prensa.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 248-254.
- Brooks, C.L. and Wei, G. (2004) Dynamics in the p53-Mdm2 Ubiquitination Pathway. *Cell Cycle*, 3, 895 - 899
- Carlson, C.A. and Kim, K.H. (1973) Regulation of Hepatic Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Phosphorylation and Dephosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 248, 378-380.
- Codogno, P. and Meijer, A.J. (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12, 1509-1518.
- Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H.S. and Frevert, E. (2006) Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*, 3, 403-416.
- Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E. and Witters, L.A. (1998) Functional Domains of the alpha 1 Catalytic Subunit of the AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 35347-35354.
- Cheng, Z., Pang, T., Gu, M., Gao, A.-H., Xie, C.-M., Li, J.-Y., Nan, F.-J. and Li, J. (2006) Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760, 1682-1689.

BIBLIOGRAFÍA

- Dasgupta, B. and Milbrandt, J. (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 7217-7222.
- Deshaies, R.J. and Joazeiro, C.A.P. (2009) RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 399-434.
- Emerling, B.M., Weinberg, F., Snyder, C., Burgess, Z., Mutlu, G.M., Viollet, B., Budinger, G.R.S. and Chandel, N.S. (2009) Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radical Biology and Medicine*, en prensa.
- Fields, S. and Song, O.-k. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340, 245-246.
- Finley, D. (2009) Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 477-513.
- Fong, A., Zhang, M., Neely, J. and Sun, S.C. (2002) S9, a 19 S proteasome subunit interacting with ubiquitinated NF-kappaB2/p100. *J Biol Chem*, 277, 40697-40702.
- Garcia-Gimeno, M.A., Munoz, I., Arino, J. and Sanz, P. . (2003) Molecular characterization of Ypil, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem* 278 47744-47752.
- Gentry, M.S., Worby, C.A. and Dixon, J.E. (2005) Insights into Lafora disease: Malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 8501-8506.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82, 373-428.
- Golemis, E.A., Serbriiskii, I., Gyuris, J. and Brent, R. (1997) Interaction trap/two-hybrid systems to identify interacting proteins *eds. John Wiley and sons, New York*.
- Gong, J., Sun, Z. and Li, P. (2009) CIDE proteins and metabolic disorders. *Current Opinion in Lipidology*, 20, 121-126
- Goransson, O., McBride, A., Hawley, S.A., Ross, F.A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D.G. and Sakamoto, K. (2007) Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 282, 32549-32560.
- Graham, F.L. and Van der Eb, A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. . *Virology* 54, 536-539.
- Haglund, K. and Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO Journal* 24, 3353-3359.

- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) THE AMP-ACTIVATED/SNF1 PROTEIN KINASE SUBFAMILY: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? *Annual Review of Biochemistry*, 67, 821-855.
- Hardie, D.G. and Hawley, S.A. (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 23, 1112-1119.
- Hardie, D.G., Hawley, S.A. and Scott, J.W. (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol*, 574, 7-15.
- Hardie, D.G. and Sakamoto, K. (2006) AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology*, 21, 48-60.
- Hunter, T. (2007) The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell*, 28, 730-738.
- Hwang, J.-T., Ha, J., Park, I.-J., Lee, S.-K., Baik, H.W., Kim, Y.M. and Park, O.J. (2007) Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Letters*, 247, 115-121.
- Hwang, J.-T., Park, I.-J., Shin, J.-I., Lee, Y.K., Lee, S.K., Baik, H.W., Ha, J. and Park, O.J. (2005) Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 694-699.
- Isono, E., Saito, N., Kamata, N., Saeki, Y. and Toh-e, A. (2005) Functional Analysis of Rpn6p, a Lid Component of the 26 S Proteasome, Using Temperature-sensitive rpn6 Mutants of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280, 6537-6547.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153, 163-168.
- Jagoe, R.T. and Goldberg, A.L. (2001) What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 4, 183-190.
- Jensen, T.E., Wojtaszewski, J.F.P. and Richter, E.A. (2009) AMPK in contraction-regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient? *Acta Physiologica*, 196, 155-174.
- Jentsch, S., Seufert, W. and Hauser, H.-P. (1991) Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1089, 127-139.
- Jorgensen, S.B., Richter, E.A. and Wojtaszewski, J.F. (2006) Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*, 574, 17-31.

BIBLIOGRAFÍA

- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1, 15-25.
- Kaiser, P., Tagwerker, C. and Raymond, J.D. (2005) Is This Protein Ubiquitinated? In *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 399, pp. 243-248.
- Kodiha, M., Rassi, J.G., Brown, C.M. and Stochaj, U. (2007) Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK→ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293, C1427-1436.
- Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B. and Korbonits, M. (2006) Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*, 17, 205-215.
- Konstantinova, I.M., Tsimokha, A.S., Mittenberg, A.G. and Kwang, W.J. (2008) Role of Proteasomes in Cellular Regulation. In *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, Vol. 267, pp. 59-124.
- Kovacic, S., Soltys, C.-L.M., Barr, A.J., Shiojima, I., Walsh, K. and Dyck, J.R.B. (2003) Akt Activity Negatively Regulates Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase in the Heart. *J. Biol. Chem.*, 278, 39422-39427.
- Krawiec, B.J., Nystrom, G.J., Frost, R.A., Jefferson, L.S. and Lang, C.H. (2007) AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292, 1555-1567.
- Kristin, R.L.-P., Vesna, M., Di, C., Huanjie, Y., Yunfeng, Z., Tak Hang, C., Bing, Y. and Dou, Q.P. (2006) The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug resistance updates* 9, 263-273.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L. and Mitch, W.E. (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1807-1819.
- Lee, Y.S., Kim, W.S., Kim, K.H., Yoon, M.J., Cho, H.J., Shen, Y., Ye, J.-M., Lee, C.H., Oh, W.K., Kim, C.T., Hohnen-Behrens, C., Gosby, A., Kraegen, E.W., James, D.E. and Kim, J.B. (2006) Berberine, a Natural Plant Product, Activates AMP-Activated Protein Kinase With Beneficial Metabolic Effects in Diabetic and Insulin-Resistant States. *Diabetes*, 55, 2256-2264.
- Legrain, P., Dokhelar, M.C. and Transy, C. (1994) Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Res*, 22, 3241-3252.

- Levine, B. and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Lin, C.-L. and Lin, J.-K. (2008) Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 930-939.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A. and Hardie, D.G. (2009) The Glycogen-Binding Domain on the AMPK [beta] Subunit Allows the Kinase to Act as a Glycogen Sensor. *Cell Metabolism*, 9, 23-34.
- Meiners, S., Ludwig, A., Stangl, V. and Stangl, K. (2008) Proteasome inhibitors: Poisons and remedies. *Medicinal Research Reviews*, 28, 309-327.
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P. and Meijer, A.J. (2006) AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Autophagic Proteolysis. *J. Biol. Chem.*, 281, 34870-34879.
- Momcilovic, M., Hong, S.-P. and Carlson, M. (2006) Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in Vitro. *J. Biol. Chem.*, 281, 25336-25343.
- Murata, S., Yashiroda, H. and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 104-115.
- Nakashima, K. and Yakabe, Y. (2007) AMPK Activation Stimulates Myofibrillar Protein Degradation and Expression of Atrophy-Related Ubiquitin Ligases by Increasing FOXO Transcription Factors in C2C12 Myotubes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 1650-1656.
- Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., Komuves, L., French, D.M., Ferrando, R.E., Lam, C., Compaan, D., Yu, C., Bosanac, I., Hymowitz, S.G., Kelley, R.F. and Dixit, V.M. (2008) Ubiquitin Chain Editing Revealed by Polyubiquitin Linkage-Specific Antibodies. *Cell*, 134, 668-678.
- Pang, T., Xiong, B., Li, J.-Y., Qiu, B.-Y., Jin, G.-Z., Shen, J.-K. and Li, J. (2007) Conserved {alpha}-Helix Acts as Autoinhibitory Sequence in AMP-activated Protein Kinase {alpha} Subunits. *J. Biol. Chem.*, 282, 495-506.
- Park, C.E., Kim, M.J., Lee, J.H., Min, B.I., Bae, H., Choe, W., Kim, S.S. and Ha, J. (2007) Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med*, 39, 222-229.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S.P. (2003) A proteomics

BIBLIOGRAFÍA

- approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotech*, 21, 921-926.
- Pickart, C.M. and Eddins, M.J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1695, 55-72.
- Pickart, C.M. and Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 610-616.
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J. and Lam, P. (2008) Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *The EMBO Journal* 27, 1537-1548.
- Rabl, J., Smith, D.M., Yu, Y., Chang, S.-C., Goldberg, A.L. and Cheng, Y. (2008) Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases. *Molecular Cell*, 30, 360-368.
- Ravid, T. and Hochstrasser, M. (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 679-690.
- Reggiori, F. and Klionsky, D.J. (2005) Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 415-422.
- Sanders, M.J., Ali, Z.S., Hegarty, B.D., Heath, R., Snowden, M.A. and Carling, D. (2007a) Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *J Biol Chem*, 282, 32539-32548.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A. and Carling, D. (2007b) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 403, 139-148.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H. and Goldberg, A.L. (2004) Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell*, 117, 399-412.
- Sanz, P. (2008) AMP-Activated Protein Kinase: Structure and Regulation *Current Protein & Peptide Science* 9, 478-492.
- Scott, J.W., Norman, D.G., Hawley, S.A., Kontogiannis, L. and Hardie, D.G. (2002) Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *Journal of Molecular Biology*, 317, 309-323.
- Shangary, S. and Wang, S. (2009) Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 223-241.

- Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X.I., Deshaies, R.J. and Robinson, C.V. (2006) Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *PLoS Biol*, 4, 1314-1323.
- Smith, D.M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y. and Goldberg, A.L. (2007) Docking of the Proteasomal ATPases' Carboxyl Termini in the 20S Proteasome's α Ring Opens the Gate for Substrate Entry. *Molecular Cell*, 27, 731-744.
- Sohn, D., Totzke, G., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Levkau, B. and Janicke, R.U. (2006a) The Proteasome Is Required for Rapid Initiation of Death Receptor-Induced Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 1967-1978.
- Sohn, D., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K. and Jänicke, R.U. (2006b) Friend or foe? The proteasome in combined cancer therapy. *Cell Cycle*, 5, 841-845.
- Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcaniz, J.V., Ros, S., Fernandez-Sanchez, M.E., Garcia-Fojeda, B., Garcia, O.C., Vilchez, D., Dominguez, J., Garcia-Rocha, M., Sanchez-Piris, M., Aguado, C., Knecht, E., Serratos, J., Guinovart, J.J., Sanz, P. and de Cordoba, S.R. (2008) Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 667-678.
- Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcañiz, J.V., Casado, M. and Sanz, P. (2006) TRIP6 transcriptional co-activator is a novel substrate of AMP-activated protein kinase. *Cellular Signalling*, 18, 1702-1712.
- Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W.O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2004) The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Molecular Cell*, 14, 395-403.
- Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85, 12-36.
- Towler, M.C. and Hardie, D.G. (2007) AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res*, 100, 328-341.
- Turner, N., Li, J.-Y., Gosby, A., To, S.W.C., Cheng, Z., Miyoshi, H., Taketo, M.M., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., James, D.E., Hu, L.-H., Li, J. and Ye, J.-M. (2008) Berberine and Its More Biologically Available Derivative, Dihydroberberine, Inhibit Mitochondrial Respiratory Complex I: A Mechanism for the Action of Berberine to Activate AMP-Activated Protein Kinase and Improve Insulin Action. *Diabetes*, 57, 1414-1418.

BIBLIOGRAFÍA

- Ventii, K.H. and Wilkinson, K.D. (2008) Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J*, 414, 161-175.
- Vernia, S., Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcaniz, J.V., Rubio, T., Garcia-Haro, L., Foretz, M., de Cordoba, S.R. and Sanz, P. (2009) AMP-activated Protein Kinase Phosphorylates R5/PTG, the Glycogen Targeting Subunit of the R5/PTG-Protein Phosphatase 1 Holoenzyme, and Accelerates Its Down-regulation by the Laforin-Malin Complex. *J. Biol. Chem.*, 284, 8247-8255.
- Viana, R., Towler, M.C., Pan, D.A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D.G. and Sanz, P. (2007) A Conserved Sequence Immediately N-terminal to the Bateman Domains in AMP-activated Protein Kinase {gamma} Subunits Is Required for the Interaction with the beta Subunits. *J. Biol. Chem.*, 282, 16117-16125.
- Vojtek, A.B., Cooper, J.A. and Hollenberg, S.M. (1997) The yeast two hybrid system. . *Oxford University Press*.
- Wang, X., Chen, C.F., Baker, P.R., Chen, P., Kaiser, P. and Huang, L. (2007) Mass Spectrometric Characterization of the Affinity-Purified Human 26S Proteasome Complex. *Biochemistry*, 46, 3553-3565.
- Witczak, C., Sharoff, C. and Goodyear, L. (2008) AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 65, 3737-3755.
- Wojtaszewski, J.F.P., Birk, J.B., Frøsig, C., Holten, M., Pilegaard, H. and Flemming, D. (2005) 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol*, 563-573.
- Yang, X., Hubbard, E.J. and Carlson, M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257, 680-682.
- Zhang, F., Hu, Y., Huang, P., Toleman, C.A., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. (2007a) Proteasome Function Is Regulated by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase through Phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.*, 282, 22460-22471.
- Zhang, F., Paterson, A.J., Huang, P., Wang, K. and Kudlow, J.E. (2007b) Metabolic Control of Proteasome Function. *Physiology*, 22, 373-379.